

## (12)特許協力条約に基づいて公開された出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局



(43)国際公開日  
2004年3月18日 (18.03.2004)

PCT

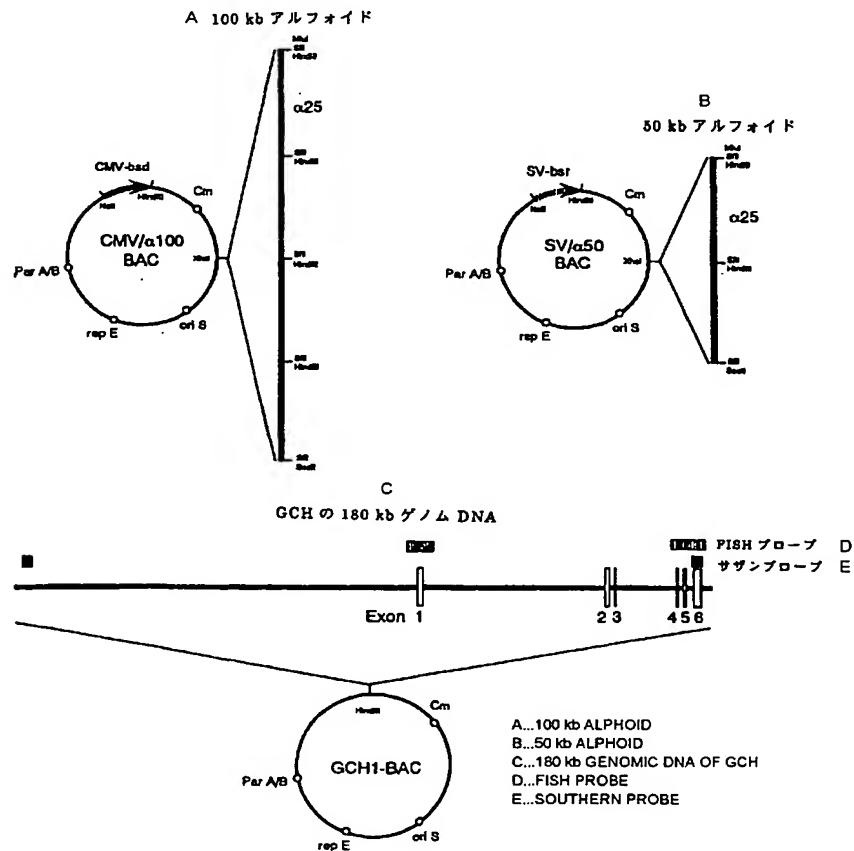
(10)国際公開番号  
WO 2004/022741 A1

- |                            |  |   |
|----------------------------|--|---|
| (51) 国際特許分類 <sup>7</sup> : | C12N 15/09, 5/10, A01K 67/027  | (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama (JP).  |
| (21) 国際出願番号:               | PCT/JP2003/011134  |   |
| (22) 国際出願日:                | 2003年9月1日 (01.09.2003)   |   |
| (25) 国際出願の言語:              | 日本語  | (72) 発明者; および   |
| (26) 国際公開の言語:              | 日本語  | (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 岡崎 恒子 (OKAZAKI,Tsuneko) [JP/JP]; 〒466-0815 愛知県名古屋市昭和区山手通り3丁目24八事ファミリーハイツ804号 Aichi (JP). 池野 正史 (IKEINO,Masashi) [JP/JP]; 〒464-0015 愛知県名古屋市天白区原1丁目505アトレ原駅前602号 Aichi (JP). 伊藤俊英 (ITOUE,Toshihide) [JP/JP]; 〒458-0814 愛知県名古屋市緑区鶴ヶ沢 |
| (30) 優先権データ:               | 特願2002-258114 2002年9月3日 (03.09.2002) JP<br>特願2002-338865 2002年11月22日 (22.11.2002) JP |   |

[統葉有]

(54) Title: ARTIFICIAL MAMMALIAN CHROMOSOME

(54)発明の名称: 哺乳類人工染色体



(57) Abstract: It is intended to provide an artificial mammalian chromosome which is stably held in mammalian cells and allows efficient expression of a target gene carried thereby. Namely, a first cyclic vector containing a mammalian centromere sequence and a selection marker gene and a second cyclic vector containing a functional sequence are transferred into mammalian host cells. Then transformed cells are selected by using the above-described selection marker gene and cells holding an artificial mammalian chromosome are selected from among the transformed cells thus selected. Thus, it is possible to construct an artificial mammalian chromosome which has a mammalian replication origin, the mammalian centromere sequence and the functional sequence, is in a cyclic form, can be replicated in mammalian cells, extrachromosomally held in the host cells and transferred to daughter cells in cell division.

(57) 要約: 哺乳類細胞内で安定的に維持され、それが保持する目的遺伝子の発現が効率的に行われ得る哺乳類人工染色体を

提供する。哺乳類セントロメア配列及び選択マーカー遺伝子を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターとを哺乳類宿主細胞に導入し、

[統葉有]

WO 2004/022741 A1



- 1-603 セジュールみどり 202号 Aichi (JP). 鈴木 伸卓  
(SUZUKI,Nobutaka) [JP/JP]; 〒464-0848 愛知県 名古屋市 千種区春岡1-11-3 昌和荘1号室 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 小西 富雅, 外(KONISHI,Tomimasa et al.);  
〒460-0002 愛知県 名古屋市 中区丸の内二丁目17番  
12号 丸の内エステートビル7階 Aichi (JP).
- (81) 指定国(国内): AU, CA, CN, JP, US.
- (84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許(AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

前記選択マーカー遺伝子を利用して形質転換細胞を選択し、選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択することにより、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列を有し、環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体を構築する。

## 明細書

## 哺乳類人工染色体

## 5 技術分野

本発明は哺乳類人工染色体に関する。詳しくは、哺乳類人工染色体の作製方法、哺乳類人工染色体、及び哺乳類人工染色体の利用に関する。本発明において提供される哺乳類人工染色体は、例えば所望の遺伝子を哺乳類細胞内へと運搬するためのベクターとして遺伝子治療、細胞、組織、又は哺乳類個体の形質転換等に利用することができる。

## 10 背景技術

有糸分裂において安定して維持されるヒト人工染色体 (HAC(s)) は数メガ bp のサイズを有し、そしていくつもの CENP-B ボックスを有する線状 (YAC) 又は環状 (BAC 又は PAC) であり、数 10 キロベースのヒト  $\alpha$  サテライト (アルフォイド) を含む前駆体 DNA コンストラクトの導入によってヒト線維芽細胞株 HT1080 内でしばしば *de novo* に形成される (Ikeda et al. 1998; Henning et al. 1999; Eber sole et al. 2000)。そのような HAC 上には必須キнетコアタンパク質が検出されるので、導入されたアルファサテライトアレイは真のヒト染色体におけるものに類似した活性型セントロメア／キネットコア構造を *de novo* に組み立てができる (Ikeda et al. 1994; Ikeda et al. 1998; Henning et al. 1999; Ebersole et al. 2000; Ando et al. 2002)。HAC は細胞内タンパク因子を利用して細胞周期ごとに複製されるので、HAC はアルフォイド配列内に一つ又は複数の複製起點も有する。テロメア配列を有するアルフォイド YAC から調製された線状の HAC はその末端に機能的テロメア構造を獲得したが、BAC 又は PAC から調製された環

状の HAC はテロメア構造を有していなかった(Ikeno et al. 1998; Ebersole et al. 2000)。

遺伝子療法によるヒト疾患の治療は取り組む価値があり且つ将来有望な分野である。我々は、欠損ヒト遺伝子の修復やそれらの機能又は制御機構を詳細に特徴付けることに利用し得る数万もの遺伝子を手にしているが、効率的な遺伝子輸送技術の開発には依然として大きな障害が存在する。哺乳動物細胞用として現在利用可能なベクターはそのほとんどが小さなウイルス由来である (Mineta et al. 1995; Fisher et al. 1997; Pfeiter & Verna 2001)。これらのベクターは所望の遺伝子(導入遺伝子)を高い効率で遺伝子導入できるという利点を有するものの、そのクローニング許容サイズは限られている。これらのベクターは小さすぎるために組織特異的制御領域を含む長いゲノム断片を挿入することができない。さらには、導入遺伝子はたいていの場合、宿主細胞の染色体内へのランダムインテグレーションの後に限って安定して維持され、そのような場合の遺伝子発現は通常予測不可能であって(ほとんどの場合は抑制される)、導入遺伝子の真の制御領域による制御は行われない。更に悪いことには、このような導入遺伝子を組み込むステップは好ましくない突然変異(ミュータジェネシス)を伴うことがある。

一方 HAC は、制御領域を含み、100 kb を越える大きさの DNA からなる大きな導入遺伝子を保持する能力を備える。導入遺伝子を含む HAC は、導入遺伝子及びアルフォイド配列の両者を有する前駆コンストラクトから (Mejia et al. 2001)、又はアルフォイド配列と導入遺伝子をそれぞれ別個に有した前駆コンストラクトから *de novo* に形成され得る (Grimes et al. 2001)。したがって、HAC は治療用途におけるベクターとしてだけでなく、大きなゲノム断片を用いることによってはじめて可能となる、組織又は器官特異的な遺伝子発現制御を解析するモデルシ

システムとしても利用できると考えられる。

### 発明の開示

本発明は以上の背景の下なされたものであって、その目的は哺乳類細胞内で遺伝子などの目的とする機能配列を安定的に発現させる技術を提供することである。具体的には、本発明は哺乳類細胞内で安定的に維持され、それが保持する機能配列の発現が効率的に行われる哺乳類人工染色体、その作製方法、及びそれを利用した細胞等の形質転換方法等を提供することを目的とする。

10 本発明者らは以上の目的に鑑み、哺乳類人工染色体を人工染色体前駆体から形成させる過程で、機能配列としての目的遺伝子を取り込む方法を採用し、目的遺伝子（GCH1 遺伝子）が発現可能に保持される哺乳類人工染色体の作製を試みた。即ち、環状ベクターである BAC を人工染色体前駆体として使用し、GCH1 遺伝子全体及びその上流制御領域をカバーする約 180kb のゲノム領域を保持する BAC (GCH  
15 1-BAC) と、ヒトセントロメア配列として約 50kb 又は約 100kb のアルフォイド配列を含む BAC (アルフォイド BAC) をヒト線維芽細胞である HT1080 細胞にコトランスフェクトした。その結果、GCH1 遺伝子を複数コピー有するヒト人工染色体 (HAC) を構築することに成功し、得られた HAC は選択操作を行わなくともヒト細胞及びマウス細胞の両者において安定して維持されることが示された。さらに検討  
20 を行ったところ、この HAC を有する形質転換株において GCH1 活性の上昇が認められ、また、その活性は染色体上に存在する場合と同様にインターフェロン $\gamma$ の誘導に応答性を示すものであった。即ち、構築された HAC から自然な状態の GCH1 遺伝子の発現が確認された。

一方、線状ベクターである YAC を前駆体として使用し、BAC の場合と同様の方法でヒト  $\beta$  グロビン遺伝子群全領域を保持するヒト人工染色体の構築に成功した。

更に、構築された HAC をマウス胚性幹細胞（ES 細胞）に移入することに成功するとともに、得られた ES 細胞を利用してキメラマウス（HAC 保有マウス）の作出にも成功した。このことは、個体レベルでの遺伝子導入ツールとして人工染色体を利用できることが実験的に確認されたという、極めて重要な意味をもつ。また、  
5 XY 核型に加えて X0 核型 ES 細胞に対しても HAC の移入に成功し、さらにそれを用いて HAC 保有のメスキメラマウスの作出にも成功した。尚、メスキメラマウスが利用できれば哺乳類人工染色体の伝達が容易になると考えられている。

また、遺伝子挿入部位を備える哺乳類人工染色体を作製する際に、後に導入される遺伝子の発現を促進する目的でインスレーター配列を組み込んで哺乳類人工  
10 染色体の構築を行ったことろ、驚くべきことに哺乳類人工染色体への遺伝子導入効率が高くなった。つまり、インスレーター配列を用いることによって、目的遺伝子を保持する哺乳類人工染色体を高効率で作製できることが判明した。

本発明は以上の検討の結果得られた知見に基づいてなされたものであって、以下の構成を提供する。

15 [1] 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第 1 ベクターと、機能配列を含む環状の第 2 ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第 1 工程と、  
形質転換細胞を選択する第 2 工程と、及び  
選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する  
第 3 工程と、  
20 を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。

[2] 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第 1 ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第 2 ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第 1 工程と、  
形質転換細胞を選択する第 2 工程と、及び  
25 選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する

第3工程と、

を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。

[3] 前記第1ベクターが選択マーカー遺伝子を有し、前記第2工程における形質転換細胞の選択は該選択マーカー遺伝子を利用して行われる、1又は2に記載の作製方法。

[4] 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、1～3のいずれかに記載の作製方法、

5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3'：配列番号1（但し、NはA,T,C,及びGのいずれかである）。

10 [5] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由來の配列を含む、1～4のいずれかに記載の作製方法。

[6] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由來の11量体繰返しユニットを含む、5に記載の作製方法。

15 [7] 前記哺乳類セントロメア配列のサイズは約50kb以下である、1～6のいずれかに記載の作製方法。

[8] 前記機能配列が目的遺伝子及びその制御領域をコードする配列からなる、1～7のいずれかに記載の作製方法。

[9] 前記目的遺伝子はハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子である、8に記載の作製方法。

20 [10] 前記目的遺伝子はヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼIの構造遺伝子である、8に記載の作製方法。

[11] 前記機能配列はヒト $\beta$ グロビン遺伝子群全領域をコードする配列である、8に記載の作製方法。

[12] 前記機能配列は、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列からなる、1～7のいずれかに記載の作製方法。

[13] 前記挿入用配列がloxPサイト若しくはFRTサイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、12に記載の作製方法。

[14] 前記第1工程において導入する、前記第1ベクターと前記第2ベクターの量比はモル比で約10：1～約1：10の範囲にある、1～13のいずれかに記載の作製方法。  
5

[15] 前記第2ベクターとして、それに含まれる機能配列が互いに異なる複数のベクターが使用される、1～14のいずれかに記載の作製方法。

[16] 前記第2ベクターがインスレーター配列をさらに含む、1～15のい  
10ずれかに記載の作製方法。

[17] 1～16のいずれかに記載の作製方法によって得られ、  
哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列を有し、  
環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及  
び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。  
15

[18] 1～16のいずれかに記載の作製方法によって得られ、  
哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに目的  
遺伝子及びその制御領域をコードする機能配列を有し、  
線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及  
び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。  
20

[19] 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、並びに目的遺伝子（ハウ  
スキーピング遺伝子を除く）及びその制御領域をコードする機能配列を有し、  
環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及  
び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。  
25

[20] 前記目的遺伝子はヒトグアナシン三リン酸シクロヒドロラーゼⅠの構  
造遺伝子である、19に記載の哺乳類人工染色体。

[21] 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに目的遺伝子（ハウスキーピング遺伝子を除く）及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

5 線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[22] 前記機能配列はヒトβグロビン遺伝子群全領域からなる、21に記載の哺乳類人工染色体。

[23] 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列を有し、

10 環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[24] 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、及び所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列を有し、

15 線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

[25] 前記挿入用配列がloxPサイト若しくはFRTサイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、23又は24に記載の作製の哺乳類人工染色体。

[26] 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、17～25のいずれかに記載の哺乳類人工染色体、

5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3'：配列番号1（但し、NはA,T,C,及びGのいずれかである）。

[27] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、17～25のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

25 [28] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由来の11量体繰返し

ユニットを含む、27に記載の哺乳類人工染色体。

[29] 前記機能配列又は前記挿入用配列を複数個有する、17～28のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

[30] インスレーター配列をさらに含む、17～29のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

[31] 17～30のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有する哺乳類細胞。

[32] 17～30のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有するヒト細胞。

[33] 17～30のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有する胚性幹細胞。

[34] 1～16のいずれかに記載の作製方法によって得られる哺乳類人工染色体又は17～30のいずれかに記載の哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程を含む、

ことを特徴とする、前記機能配列又は前記挿入用配列が長期間安定して維持可能な状態に導入された哺乳類細胞の作製方法。

[35] 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、形質転換細胞を選択する第2工程と、

選択された形質転換細胞の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する第5工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

[3 6] 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換細胞を選択する第2工程と、

5 選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する第5工程と、

10 を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

[3 7] 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換細胞を選択する第2工程と、

15 選択された形質転換細胞の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程と、

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

20 選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

[3 8] 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

25 形質転換細胞を選択する第2工程と、

選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する  
第3工程と、

選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程  
と、

5 融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有す  
るハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、  
を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

[39] 37又は38に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲッ  
10 ツ細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

[40] 17～30のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞  
から哺乳類人工染色体を分離する工程と、及び

15 分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入  
する工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

[41] 17～30のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞  
と、微小核形成能を有する哺乳類細胞と、を融合させる工程と、

20 融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有す  
るハイブリッド細胞を選択する工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる工程と、  
を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

[42] 41に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞と  
しての哺乳類細胞とを融合させる工程、

25 を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

[4 3] 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、又は組織幹細胞である、34、35、36、39、40、及び42のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

[4 4] 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、又は組織幹細胞を、特定の組織の細胞へと分化するように誘導してなる細胞である、34、35、36、39、40、及び42のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

[4 5] 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、哺乳類の受精卵である、34、35、36、39、40、及び42のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

[4 6] 哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターであって、サイズが約50kb以下の哺乳類セントロメア配列、及び選択マーカー遺伝子を含むベクター。

[4 7] 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、46に記載のベクター、

5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3'：配列番号1（但し、NはA,T,C、及びGのいずれかである）。

[4 8] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由来の配列を含む、46又は47に記載のベクター。

[4 9] 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由来の11量体繰返しユニットを含む、48に記載のベクター。

[5 0] 哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターであって、loxPサイト若しくはFRTサイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列と、  
インスレーター配列と、を含むベクター。

[5 1] 哺乳類人工染色体が導入されてなる、非ヒト形質転換動物。

[5 2] 前記哺乳類人工染色体が、17～19のいずれかに記載の哺乳類人工染色体である、51に記載の非ヒト形質転換動物。

[5 3] 哺乳類人工染色体が導入されてなる、X0型マウス胚性幹細胞。

5 [5 4] 前記哺乳類人工染色体が、17～19のいずれかに記載の哺乳類人工染色体である、53に記載のX0型マウス胚性幹細胞。

[5 5] 哺乳類人工染色体が導入されてなる、メスキメラマウス。

[5 6] 前記哺乳類人工染色体が、17～19のいずれかに記載の哺乳類人工染色体である、55に記載の、メスキメラマウス。

10

#### 図面の簡単な説明

図1は、形質転換株内におけるコトランスクレクトBACの運命についてまとめた表である。GCH1-BACに加えてCMV/α100BAC又はSV/α50BACを用いたコトランスクレクションによって得られたBS耐性細胞株をFISHで解析した結果が示される。「HAC上」は、α21-IアルフォイドDNAプローブとBACベクタープローブの両方で検出された人工染色体を保有する細胞株を示す。これらの細胞株のメタフェイズ・スプレッドの95%以上においてそれぞれ一つのHACが検出された。残りの細胞では、導入されたBACはHT1080の染色体に組込まれたか（染色体上）、又はFISH解析においてシグナルが検出できなかった（検出されず）。「GCHを保有するHAC」は、GCH1遺伝子のシグナルが認められたHACを保有する細胞株を示す。

図2は、HAC保有細胞株におけるGCH1活性の測定結果をまとめた表である。IFN-γ誘導の存在下、及び非存在下においてHT/GCH2-10、HT/GCH5-18及びHT1080細胞におけるGCH1活性を測定した結果が示される。表中の各データはこれら三つの独立した実験から得られた平均値±標準偏差で表されている。

25 図3は、アルフォイドBAC及びGCH1-BACのコンストラクトを示す図である。CMV/

$\alpha$  100 BAC は、BAC ベクター内にヒト 21 番染色体由来の 100kb の  $\alpha$  21-I アルフォイド配列、及び哺乳類細胞を選択するための CMV-Bsd (アスペルギルス・テレウス (*Aspergillus terreus*) 由来の Blasticidin S デアミナーゼ遺伝子) 選択マークを含む。SV/ $\alpha$  50 BAC は、50kb の  $\alpha$  21-I アルフォイド配列、及び SV2-Bsr (バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) 由来の Blasticidin S デアミナーゼ遺伝子) 選択マークを含む。GCH1-BAC は GCH1 遺伝子を含む 180 kb のゲノム DNA 断片を含む。FISH 解析用、サザン解析用、及び GCH1 遺伝子のエクソン (1~6) 用のプローブとして使用された領域は、それぞれハッチングを施したボックス、黒塗りのボックス、及び白抜きのボックスで表される。BAC ベクターは *E. coli* 内での選択のためのクロラムフェニコール耐性遺伝子 (Cm) を含む。

図 4 は、HAC 上の GCH1 シグナルを検出するための FISH 解析の結果を示す図である。HT/GCH2-10 細胞株 (CMV/ $\alpha$  100 BAC と GCH1-BAC のコトランスフェクションによって形成された)、及び HT/GCH5-18 (SV/ $\alpha$  50 BAC と GCH1-BAC のコトランスフェクションによって形成された) に GCH1 エクソン 1 プローブ (緑) 及び BAC ベクタープローブ (赤) を (左欄)、又は GCH1 エクソン 456 (緑) 及び GCH1 エクソン 1 (赤) を (右欄) ハイブリダイズさせている。矢じりは HAC を示す。

図 5 は、GCH1-HAC の構造解析の結果を示す図である。HAC 内の GCH1 遺伝子を制限酵素分析した結果が示される。HT/GCH2-10、HT/GCH5-18、及びトランスフェクションを行っていない HT1080 から調製したゲノム DNA を BamHI (A) 又は StuI (B) で消化し、常法的なゲル電気泳動で分画した。内在性 GCH1 遺伝子座及び GCH1-BAC を使用した場合に、US プローブ (A) 及びエクソン 6 プローブ (B) によって検出される BamHI 断片及び StuI 断片の予想されるサイズが上段に示される。

図 6 は、ドットハイブリダイゼーションによる HAC 内の GCH1-BAC 及びアルフォイド BAC のコピー数の推定に用いたグラフ図である。左欄は GCH1 エクソン 6 プローブで得られた強度値である。GCH1-BAC (0.4, 0.2, 0.1ng) の入力 DNA と、HT1080、

HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 からそれぞれ調製したゲノム DNA(1.0, 0.5 μg)とを GCH1 エクソン 6 プローブとハイブリダイズさせた。0.1ng の GCH1-BAC DNA の強度値を基準値として使用した。右欄は BAC ベクタープローブで得られた強度値である。GCH1-BAC(0.5, 0.1, 0.05ng)と、HT1080、HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 から 5 それぞれ調製したのゲノム DNA(0.5, 0.25μg)とを BAC ベクタープローブとハイブリダイズさせた。各プローブで得られたシグナル強度はフジ・イメージアナライザーBAS1000 を使用して決定した。

図 7 は、HAC 保有細胞株とマウス A9 細胞との細胞融合によって得られたハイブリッド細胞を FISH 解析した結果を示す図である。HT/GCH5-18 細胞株を PEG を利用して A9 細胞と融合させた。BS 耐性及びウワバイン耐性の細胞株を FISH で解析した。メタフェイズ・スプレッドを BAC ベクタープローブ（赤）及び Alu 反復配列プローブ（緑）と (A)、又は BAC ベクタープローブ（緑）及びマウス・マイナーサテライトプローブ（赤）と (B) ハイブリダイズさせた。矢印は HAC を示す。

図 8 は、HAC を移入した ES 細胞を FISH 解析した結果を示す図である。A はアルフォイド DNA 及び BAC ベクターをプローブとして検出した結果であり、B は GCH1 のエクソン 1 領域及び BAC ベクターをプローブとして検出した結果であり、C はマウスマイナーサテライト DNA と BAC ベクターをプローブとして検出した結果である。

図 9 は、ES 細胞中での HAC の安定性を解析した結果を示す図である。黒塗りのボックスはblast S 存在下(bs+)で培養した場合における HAC 保有細胞の割合であり、白抜きのボックスはblast S 非存在下(bs-)で培養した場合における HAC 保有細胞割合である。

図 10 (A)は、A201F4.3 (1 レーン及び 2 レーン) 及び 7c5hTEL (3 レーン及び 4 レーン) を PEGE で分析した結果を示す図である。宿主の染色体に加えて 150kb 25 又は 100kb にグロビン又はアルフォイド YAC が存在するのが認められる (1 レー

ン及び 3 レーン)。YAC を精製、濃縮し (2 レーン及び 4 レーン)、混合した YAC (5 レーン) を HT1080 細胞に導入した。図中の M は分子量マーカーを示す。図 10 (B) は、YAC の導入によって得られた形質転換株に対する FISH 解析の結果を示す図である。形質転換株に認められたミニ染色体が矢印で示される (上段)。また、YAC 5 の腕部 (緑色 : 矢じり) とアルフォイド (赤色 : 矢印) のシグナルが存在する (下段)。DAPI で染色している (青色)。

図 11 は、ミニ染色体を保有する形質転換株に対する FISH 解析の結果を示す図である。プローブとして YAC の腕部 (緑色、矢じり) 及びアルフォイド (赤色、矢印) を用いた結果 (左上)、同図下段に示される  $\beta$  グロビンの A (緑、矢じり) 及びアルフォイド (赤、矢印) を用いた結果 (右上)、 $\beta$  グロビンの B (緑、矢じり) 及びアルフォイド (赤、矢印) を用いた結果 (左下)、 $\beta$  グロビンの C (緑、矢じり) 及びアルフォイド (赤、矢印) を用いた結果 (右下) である。

図 12 は、ミニ染色体を保有する形質転換株である二つのクローン (C11 及び C29) に対してヒト  $\beta$  グロビンプローブ (配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 15 9) 又はテロメア反復配列 (配列番号 8 の配列が繰り返されてなる約 500bp の配列) をプローブとして行った FISH 解析の結果を示す図である。青、緑、赤はそれぞれ DAPI、ヒト  $\beta$  グロビン、テロメアのシグナルである。

図 13 は、A9 細胞とミニ染色体保有細胞の融合により得られた形質転換細胞の FISH 解析結果を示す図である。左上欄は DAPI (青) による染色結果、右上欄はヒト  $\beta$  グロビンプローブ (配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 9 の混合) によるシグナル (緑) を検出した結果、左下欄はアルフォイドプローブ (配列番号 3) によるシグナル (赤) を検出した結果、右下欄はこれらを重ね合わせたものである。アルフォイドのシグナルはミニ染色体にのみ認められる。

図 14 は、ミニ染色体のファイバーFISH 解析の結果を示す図である。上段は  $\beta$  25 グロビンプローブ (配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 9 の混合) を用いた

結果、中段はアルフォイドプローブ（配列番号3）を用いた結果、下段は以上の二つの結果を重ね合わせたものである。アルフォイド及び $\beta$ グロビンの各シグナルはそれぞれ赤及び緑で表される。

図15は、HAC保有細胞におけるグロビン遺伝子の転写量を解析した結果を示す図である。上段はRT-PCR法による解析結果、下段はリアルタイムPCR法による解析結果である。図中の+及び-はそれぞれHAC保有及びHAC非保有を表す。

図16(a)は、HAC保有ES細胞株を用いて作出されたキメラマウスを示す図である。図16(b)は、HAC保有ES細胞を導入した胚を移植したマウス（仮親）から自然分娩により得られた仔マウス（生後24時間）の各種臓器由来DNAに対するPCR解析の結果である。TT2はES細胞を、TT2/GCH2-10はHAC保有ES細胞を、brainは脳を、heartは心臓を、thymusは胸腺を、liverは肝臓を、spleenは脾臓を、kidneyは腎臓をそれぞれ表す。また、c1～c15は各個体を表す。図16(c)は、ES細胞を用いて作出したマウス個体に対するFISH解析の結果を示す図である。アルフォイド配列のシグナル及びBACベクターのシグナルが観察される（矢じり）。

図17は、HAC保有のX0核型ES細胞株を用いて作出されたキメラマウスを示す図である。

図18は、哺乳類人工染色体の構築に使用したアクセプター前駆体BAC-LCR-lox71の特徴部分を示す図である。

図19は、ヒト $\beta$ グロビンLCR及びlox部位を含む前駆体を使用して構築された人工染色体において、EGFP強度を測定した結果の図である。HAC：ヒト $\beta$ グロビンLCR及びlox部位を含む前駆体を使用して構築された人工染色体、INT1及びINT2:pEGFP-C1を染色体上のランダムな場所に組み込んだ安定株の中から、EGFPの蛍光強度の高い順に選択した二つの細胞株。右下のグラフは、各測定結果をグラフ化したものである。

### 発明を実施するための最良の形態

本発明の第1の局面は哺乳類人工染色体 (mammalian artificial chromosome) の作製方法に関し、環状ベクターを前駆体として用いる方法と線状ベクターを前駆体として用いる方法を包含する。尚、以下の説明において哺乳類人工染色体を MAC ともよび、これにはヒト人工染色体 (human artificial chromosome; 以下、「HAC」ともいう) が含まれる。

#### (哺乳類人工染色体の前駆体としてのベクター)

本発明では哺乳類人工染色体 (MAC) 前駆体として第1ベクター (環状ベクター又は酵母人工染色体) と第2ベクター (環状ベクター又は酵母人工染色体) が用いられる。第1ベクターは哺乳類セントロメア配列を含み、MAC の複製及び安定的な維持に必要なセントロメアを供給し、他方、第2ベクターは機能配列を含み、MAC に組込まれる機能配列の供給源となる。それに含まれる機能配列が互いに異なる複数種類の第2ベクターを使用することもできる。即ち、例えば第1ベクターと、それに含まれる機能配列が異なるベクターを2種類使用して本発明の MAC を作製することができる。このように複数種類の第2ベクターを使用すれば、複数の機能配列が発現可能に保持された MAC を構築することが可能となる。このことは例えば、協同的に作用する複数の遺伝子などを同時に導入するためのツールとして本発明の MAC を利用できることを意味する。

第1ベクター及び第2ベクターとして環状ベクター又は線状ベクターが使用される。環状ベクターとしては細菌 (大腸菌など) において自律複製できる BAC (bacterial artificial chromosome) 又は PAC (P1 artificial chromosome) を用いることができる。BAC 又は PAC を使用することは、導入操作、増幅、維持など

の取り扱いが容易であり、また様々な種類のものを入手可能であるといった利点を有する。

本発明で使用される環状ベクターは公知の BAC 又は PAC に必要な改変を施すことにより構築され得る。例えば、Belo-BAC (New England Biolabs inc., Beverly, MA 01915-5599) を出発材料として、これに制限酵素処理等によって哺乳類セントロメア配列の挿入部位を作製し、この挿入部位に別途用意した哺乳類セントロメア配列を挿入することにより、哺乳類セントロメア配列を含む環状ベクター（第 1 ベクター）を構築することができる。一方、機能配列を含むベクター（第 2 ベクター）は、そのクローンを含むライブラリーが提供されている場合には当該ライブラリーから調製することができる。勿論のこと、第 1 ベクターと同様に、公知のベクターに遺伝子工学的手法を用いて第 2 のベクターを作製してもよい。

線状ベクターとしては酵母内で染色体として機能する DNA コンストラクト（酵母人工染色体、以下、「YAC」ともいう）が使用される。この場合の第 1 ベクターは哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列を少なくとも含む。ここで、「哺乳類テロメア」とは哺乳類の染色体のテロメア領域に存在する繰り返し配列をいう。ヒトテロメアは 5' -TTAGGG-3' が繰り返されて構成されており、ヒト人工染色体 (HAC) を作製する場合にはこの配列の繰り返しを含んでいるセントロメア配列を用いることが好ましい。

第 1 ベクター及び／又は第 2 ベクターが選択マーカー遺伝子を含んでいることが好ましい。これらのベクターを用いてトランスフォーメーション（トランスフェクション）を行った際に、選択マーカー遺伝子を利用して形質転換細胞を容易に選択することが可能となるからである。いずれかのベクターのみが選択マーカ

ー遺伝子を含んでいることがさらに好ましい。選択マーカーの使用数を削減することにより、MAC の作製あるいはその利用の過程において必要な各選択操作がより簡便化されるからである。

さらに、第 1 ベクターのみが選択マーカー遺伝子を含んでいることが特に好ま  
5 しい。かかる構成によれば、選択マーカー遺伝子を利用して哺乳類セントロメア配列が適切に導入された形質転換細胞を選択することができ、即ち染色体として機能する DNA コンストラクトを保有する可能性の高い形質転換細胞を効率的に選択することが可能となる。その一方で、機能配列を含むベクター（第 2 ベクター）  
10 に選択マーカーを挿入する必要がなくなることから、選択マーカー遺伝子を含まないクローンの集合からなる市販のライブラリーから調製したベクターをそのままの状態で（即ち、選択マーカー遺伝子を挿入する操作を経ることなく）第 2 ベクターとして使用できるという利点も有する。加えて、第 2 ベクターが選択マーカー遺伝子を含む必要がないことは、その分だけ第 2 ベクターに挿入できるインサート DNA のサイズに余裕ができ、結果としてより大きなサイズの機能配列を保  
15 持する MAC の構築が可能となる。

#### （哺乳類セントロメア配列）

本発明において「哺乳類セントロメア配列」とは、哺乳類細胞内においてセントロメアとして機能する配列をいう。哺乳類セントロメア配列としては、例えばヒト染色体のアルファサテライト領域由来の配列を用いることができる。ここでの「アルファサテライト領域由来の配列」とはアルファサテライト領域の一部又は全部の配列、又はこれらいずれかの配列の一部に改変を施した配列を意味する。ここでの「一部に改変」とは、対象となる配列において 1 若しくは複数の塩基を置換、欠失、挿入、及び／又は付加することをいう。このような改変は複数の領域にな  
25 されていてもよい。

ヒト染色体のアルファサテライト領域には一般に、5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3' (配列番号1)からなるCENP-B boxと呼ばれる配列が規則的間隔で複数個配置されている (Masumoto et al. NATO ASI Series. vol. H72, Springer-Verlag. pp 5 31-43, 1993; Yoda et al. Mol. Cell. Biol., 16, 5169-5177, 1996)。本発明における哺乳類セントロメア配列は、好ましくはこのCENP-B boxを高頻度に有する領域を含んでいる。

ヒト21番染色体のアルファサテライト領域由来の配列を用いることが好ましい。ヒト21番染色体のアルファサテライト領域については詳細な検討がされており $\alpha$ 21-1と呼ばれる領域が存在する。 $\alpha$ 21-1領域はアルフォイド11量体繰り返しユニットと呼ばれる配列を備え、この繰り返しユニットでは5'-NTTCGTTGGAAACGGGA-3' (配列番号2)なるCENP-B boxが規則的間隔で複数個配置されている (Ikeno et al. Human Mol. Genet., 3, 1245-1247, 1994)。

好ましくは、本発明における哺乳類セントロメア配列はこのようなアルフォイド11量体繰り返しユニットを複数有する。ヒト21番染色体のアルフォイド領域から分離され、同定された配列を配列番号3 (約25kbのアルフォイド断片)に示す。

セントロメア配列は、構築された哺乳類人工染色体において適切な機能を有するセントロメアが形成されるのに十分な長さを有する。例えば約25kb～約150kbのサイズ (例えば約50kb、約80kb、約100kb) のセントロメア配列を用いる。好ましくは約80kb以下、さらに好ましくは約50kb以下のセントロメア配列を用いる。サイズの小さなセントロメア配列を用いることは、これを含む第1ベクターの分離、精製などの操作を容易とし、またクローニング及び／又は増殖時に生じ

得る脱落、改変などの確率を低下させる。ここで、後述の実施例で示されるよう  
に、環状ベクター（BAC）を用いた例において約 50kb のアルフォイド DNA をセン  
トロメア配列として用いた場合においてもセントロメア／キнетコア構造を適切  
に形成可能な人工染色体が構築されることが確認されている。同様に、線状ベク  
5 ター（酵母人工染色体）を用いた例において約 80kb のアルフォイド DNA をセント  
ロメア配列として用いた場合においてもセントロメア／キнетコア構造を適切に  
形成可能な人工染色体が構築されることが確認されている。

哺乳類セントロメア配列は、適当なヒト細胞や、WAV17 等のヒト染色体を保有  
10 する融合細胞、又はヒト以外の哺乳類細胞から調製され得る。例えば、これらの  
中のいずれかの細胞をアガロースプラグとして固定した後、制限酵素処理、バル  
スフィードゲル電気泳動（以下、「PEGE」ともいう）等によって目的のセントロメ  
ア配列を含む DNA 断片を精製、濃縮する。その後、適当なベクターにクローニン  
グし、使用に供する。

15 一方、哺乳類セントロメア配列を保有するクローンを含むライブラリーを利用する  
できる場合には、これから適宜制限酵素処理等を用いて哺乳類セントロメア配列  
を取得することができる。たとえば、LL21NC02 ライブラリー（Lawrence Livermo  
re Laboratory）を利用して  $\alpha$ 21-I アルフォイド断片を取得し、この断片を哺乳  
類セントロメア配列として使用することができる。この場合、取得した  $\alpha$ 21-I ア  
20 ルフォイド断片を複数用いて哺乳類セントロメア配列を構築してもよい。さらには、互いに大きさの異なる  $\alpha$ 21-I アルフォイド断片を複数取得し、これらを組合  
わせて哺乳類セントロメア配列を構築してもよい。

（哺乳類複製起点）

25 一般に哺乳類セントロメア配列内には一つ以上の複製起点が存在する。従って、

通常、哺乳類セントロメア配列を含む第1ベクターには哺乳類複製起点が含まれる。使用する哺乳類セントロメア配列が哺乳類複製起点を含んでいない場合には、別途、哺乳類複製起点を第1ベクター又は第2ベクターに含有させる。但し、第2ベクターが保持する機能配列が既に哺乳類複製起点を含んでいる場合にはこの  
5 限りでない。

(機能配列)

機能配列はそれが発現することによって特定の作用が奏される配列をいい、典型的には目的遺伝子及びその制御領域をコードする配列からなる。本発明の機能  
10 配列として、それが発現することによって特定の遺伝子発現の抑制や特定の RNA の働きを抑制する等の機能を有する配列、例えばいわゆるアンチセンス RNA やリボザイム RNA 等をコードする配列を用いることもできる。

目的遺伝子としては種々の遺伝子を採用することができ、ヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼ I (GCH1) 遺伝子、ヒト  $\beta$  グロビン遺伝子群、RB や p53 などの癌抑制遺伝子、c-myc や p53 などのアポトーシス誘導遺伝子、サイトカイン、各種増殖因子、抗体、腫瘍抗原等をコードする遺伝子等をその例として挙げることができる。目的遺伝子をコードする配列はゲノム DNA であっても cDNA であってもよい。

機能配列として、複数の目的遺伝子をコードする配列を含むものを用いることができる。このような配列としては、複数のタンパク質が相互作用して特定の効果が得られる場合において当該複数のタンパク質に対応する塩基配列を含むものや、一連の反応系に必要な複数の酵素に対応する塩基配列を含むものを例示することができる。このような場合には、各発現産物に対応する配列ごとにその発現を制御する配列を使用することも可能であるが、全ての発現産物或は一部（二つ  
25 以上）の発現産物の発現を一括して制御することが可能な配列を使用してもよい。

例えば、複数の発現産物に対応する配列を一つのプロモーター配列の制御下に配置して構成したコンストラクトを使用することができる。

目的遺伝子の配列は例えば公知のライブラリーから調製することができる。目的遺伝子（及びその制御領域）の配列を含むベクタークローニングからなるライブラリーを利用可能な場合には、これから調製される目的遺伝子（及びその制御領域）の配列を含むベクターを本発明の第2ベクター（又はその作製材料）として用いることもできる。例えば、CITB (California Institute of Technology) Human BAC Libraries、RPCI-11 (Roswell Park Cancer Institute) Human BAC Library など (Keio University)、CITB Mouse BAC Library、RPCI-22 Mouse BAC Library などの BAC ライブラリーや、RPCI Human PAC Libraries、RPCI-21 Mouse PAC Library などの PAC ライブラリー、又は CEPH Human YAC Library、Washington University Human YAC library、WI/MIT 820 YAC Library、Whitehead I Mouse YAC Library などの YAC ライブラリー（以上、Research Genetics 社、2130 Memorial Parkway SW, Huntsville, AL 35801, US）を利用することができる。

本発明ではクローニング許容サイズの大きなベクターを使用することから、構造遺伝子に加えてその制御領域を含む大きなサイズの DNA 断片を機能配列として用いることができる。ここで制御領域は、原則的には目的遺伝子自身の制御配列（染色体で目的遺伝子の制御に直接関与している領域の配列）を意味するが、その機能が維持される限度においてこれに一部の改変を施した配列であってよい。ここで「一部の改変」とは、対象となる配列において 1 若しくは複数の塩基を置換、欠失、挿入、及び／又は付加することをいう。このような改変は複数の領域になされていてもよい。

所望の配列を特異的に挿入するための配列（本発明において、「挿入用配列」と

いう) を機能配列として含む第2ベクターを用いることができる。このような第2ベクターを用いれば所望の配列を後から挿入可能な、汎用的な哺乳類人工染色体(MAC)を構築することができる。ここで所望の配列とは、典型的には所望の遺伝子をコードする配列(好ましくは併せてその制御領域コードする配列を含む配列)であるがこれに限定されるものではなく、それが発現することによって特定の遺伝子発現の抑制や特定のRNAの働きを抑制する等の機能を有する配列、例えばいわゆるアンチセンスRNAやリボザイムRNA等をコードする配列であってもよい。

10 挿入用配列の種類は特に限定されるものではないが、loxPサイト又はFRT(FRT: FLP Recombination Target)サイト等を好適に用いることができる。例えばloxPサイトを用いれば、まずloxPサイトを有するMACが作製され、これにCreリコンビナーゼを作用させることによって部位特異的に所望の配列を導入することができ、最終的に所望の配列を含むMACが構築される。同様に、FRTサイトを有するMACを作製した場合にはFLPリコンビナーゼを利用して最終的に所望の配列を含むMACを構築することができる。尚、loxPサイト又はFRTサイト等の一部を改変した配列であっても所望の配列を挿入する機能を有する限りにおいて挿入用配列として使用することができる。改変の例としては、その一部を削除、追加、或は置換などして導入効率を高めたり又は導入反応のみが特異的に行われるようとする

15 ことが挙げられる。

20

哺乳類セントロメア配列を含む第1ベクターと、機能配列としての挿入用配列を含む第2ベクターの使用割合を調整することにより、作製される哺乳類人工染色体内に組込まれる挿入用配列の数を変えることが可能である。また、このような第1ベクターと第2ベクターとの共導入によって哺乳類人工染色体を作製すれ

ば、作製される哺乳類人工染色体においてそのセントロメアから離れた位置（即ちセントロメアに挟まれない位置）に挿入用配列を組込むことが可能であり、適切に機能する挿入配列を保持した哺乳類人工染色体が構築される。

- 5 本発明で使用される第2ベクターがインスレーター配列を有していることが好ましい。ここにインスレーター配列とは、エンハンサー・プロッキング効果（隣会う遺伝子の発現が互いに影響を受けない）又は染色体バウンダリー効果（遺伝子発現を保証する領域と遺伝子発現が抑制される領域を隔て区別する）を発揮することによって特徴付けられた塩基配列のことをいう。インスレーター配列を使用
- 10 することによって、哺乳類人工染色体が保持する目的遺伝子の発現が促進されることを期待できる。一方、後述の実施例に示されるように、上記の loxP 等の挿入用配列を使用する際にインスレーター配列を併用すれば、哺乳類人工染色体への目的遺伝子の導入効率が高くなることが判明した。このように、インスレーター配列を使用すれば哺乳類人工染色体への遺伝子導入効率を高めるという効果も奏
- 15 され、効率的且つより確実に、目的遺伝子を保持した哺乳類人工染色体の構築が可能となる。使用できるインスレーター配列は特に限定されず、既にインスレーターとして同定されている配列は勿論のこと、期待される効果（目的遺伝子の発現促進又は遺伝子導入効率の上昇）を減殺しない限度でそれらの配列に改変を加えた配列などを本発明におけるインスレーター配列として用いることができる。
- 20 複数のインスレーター配列を併用してもよい。複数のインスレーター配列を併用する場合には、一種類のインスレーター配列のみを使用しても、複数種類のインスレーター配列を組み合わせて使用してもよい。尚、これまでにインスレーター配列として、ヒト  $\beta$  グロビン HS1～5、ニワトリ  $\beta$  グロビン HS4 (*chicken β-globin HS4*)、ショウジョウバエ・ジプシーレトロトランスポゾン (*Drosophila gypsy retrotransposon*)、ウニ・アリールスルファターゼ 5' フランкиング領域 (*sea urchin arylsulphatase 5' flanking region*) を用いて構築された人工染色体が開発された。
- 25

a urchin 5' flanking region of arylsulfatase)、ヒト T 細胞受容体  $\alpha/\delta$  の阻害因子  $\alpha/\delta$  (blocking element  $\alpha/\delta$  of human T-cell receptor  $\alpha/\delta$ )、アフリカツメガエル・40S リボソーム RNA 遺伝子リピートオーガナイザー (repeat organizer of Xenopus 40S ribosomal RNA gene) 等が知られている。

5 インスレーター配列を使用する場合に用いられる哺乳類人工染色体前駆体（第 2 ベクター）の具体例としては、機能配列として loxP 等の挿入用配列を有し、当該挿入用配列の 5' 側にインスレーター配列を有するものを挙げることができる。

挿入用配列の 5' 側ではなく 3' 側にインスレーター配列を配置した哺乳類人工染色体前駆体（第 2 ベクター）としてもよく、或いは、挿入配列を挟むように両 10 側にインスレーター配列を配置した哺乳類人工染色体前駆体（第 2 ベクター）としてもよい。さらに、いずれの位置に配置する場合においても、複数のインスレーター配列を連続的に又は他の配列を介在させて配置することとしてもよい。

#### （宿主細胞）

15 第 1 ベクター及び第 2 ベクターを導入する宿主細胞としては、その中で両ベクター間の組換えが行われるものが使用される。例えばヒト線維芽肉腫細胞株である HT1080 細胞、HeLa 細胞、CHO 細胞、K-562 細胞等を宿主細胞として使用することができる。

#### 20 （哺乳類染色体の作製方法）

本発明の哺乳類人工染色体（MAC）の作製方法は、(1) 哺乳類セントロメア配列を含む第 1 ベクターと、機能配列を含む第 2 ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第 1 工程、(2) 形質転換細胞を選択する第 2 工程、及び(3) 選択された形質転換細胞の中から MAC を保有する細胞を選択する第 3 工程を含む。

25 第 1 工程における第 1 ベクターと第 2 ベクターの導入方法は特に限定されるも

のではないが、これら二つのベクターを同時に哺乳類宿主細胞に導入することが好ましい。哺乳類宿主細胞内でのベクター間の組換えを効率的に行うためである。また、導入操作が簡便化されるからである。二つのベクターを同時に導入するためには、例えば導入操作に先立って両ベクターを混合しておき、そして宿主細胞  
5　　への導入を行えばよい。

導入に供する第1ベクターと第2ベクターの量比は、機能配列を発現可能に保持した MAC が適切に形成されるように、例えば第1ベクター：第2ベクターをモル比で約 10 : 1 ~ 約 1 : 10 とする。好ましくは第1ベクター：第2ベクター  
10　　を約 1 : 1 とする。ここで、第1ベクターが少な過ぎる場合には活性のあるセン  
トロメアを含む MAC が形成されないおそれがあり、他方第2ベクターが少な過ぎ  
る場合には MAC に機能配列が取り込まれないおそれがある。一方で、第2ベクター  
15　　の量を多くすることで効率的に機能配列を取り込ませ、その結果、機能配列を複数コピー保持する MAC が構築されることを期待できる。後述の実施例で示され  
るよう、本発明の作製方法によれば目的遺伝子を複数コピー保持する哺乳類人  
工染色体の構築に成功している。目的遺伝子を複数コピー有する MAC では必然的に目的遺伝子の発現トータル量が多くなる。従って、本発明の MAC を目的遺伝子  
の導入用ベクターとして使用する場合において、導入細胞内での高い発現効果が得られる。このことは本発明の MAC を遺伝子治療用のベクターとして用いる場合  
20　　に特に有益である。薬剤又は薬剤の候補化合物の作用・効果を評価するための材料として用いる場合においても同様に有益である。

宿主細胞への各ベクターの導入方法は特に限定されず、リポフェクション (Fel  
gner, P.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 7413-7417 (1984))、リ  
25　　ン酸カルシウムを利用したトランスフェクション、マイクロインジェクション (G

raessmann, M. & Graessmann, A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 366-370 (1976)、エレクトロポーレーション(Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 7161-7165 (1984))等の方法を採用することができる。

- 5 宿主細胞内では第1ベクターと第2ベクターとの間で組換えが生じ、その結果として第1ベクター由来のセントロメア配列と第2ベクター由来の機能配列とを備えた MAC が形成される。

第1ベクターと第2ベクターを導入した後に形質転換細胞（形質転換体）が選  
10 択される（第2工程）。形質転換細胞の選択は、第1ベクター又は第2ベクターに予め挿入しておいた選択マーカー遺伝子を利用してベクター導入後の細胞を選択的に培養することにより行うことができる。尚、両ベクターを導入後の細胞群から任意に細胞を分離した結果、分離した細胞が形質転換細胞である場合における当該分離する操作も本発明にいう「形質転換細胞の選択」に含まれる。

15 形質転換細胞を選択した後に MAC を保有する細胞が選択される（第3工程）。かかる選択操作は MAC に特異的なプローブや抗体などを用いた検出法によって行うことができる。具体的には、例えば第1ベクターが含む哺乳類セントロメア配列の少なくとも一部に対して特異的にハイブリダイズするプローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法によって行うことができる。この工程において第2ベクターが適切に組込まれて MAC が形成されていることを確認するために、第2ベクターに特異的な配列（例えば機能配列）の少なくとも一部に対して特異的にハイブリダイズするプローブを用いて同様のハイブリダイゼーション分析を併せて行うことが好ましい。以上において使用される各プローブの検出には蛍光物質、  
20 放射性物質などを利用できる。プローブの標識に蛍光物質を用いる方法は FISH(F  
25

luorescence in situ hybridization) 法と呼ばれ、安全かつ簡便に MAC を検出できる (Lawrence, J. B. et al. Cell 52:51-61, 1998; Takahashi, E. et al. Jpn. J. Hum. Genet. 34:307-311, 1989)。

第 3 工程に加えて、機能配列が適切に組込まれた MAC が形成されていることを  
5 確認する工程を行うことが好ましい。かかる確認工程は、例えば機能配列が目的  
遺伝子を含む場合には当該遺伝子の発現産物を検出することによって行なうことが  
できる。

以上の作製方法で得られる哺乳類人工染色体 (MAC) は非選択条件下においても  
10 極めて安定的に維持される。尚、ここでの「非選択条件」とは、MAC が存在する細  
胞のみの生存を可能にするような選択操作を行わない条件をいう。

使用する前駆体ベクター及び宿主細胞の種類等によっても異なるものと予想さ  
れるが、本発明の作製方法によれば宿主細胞への DNA コンストラクト (第 1 ベク  
ター及び第 2 ベクター) の導入操作後、非選択条件下、約 30 日経過後 (約 30 繼  
15 代後) に細胞 (集団) の約 95% 以上に MAC を保有させることができ、しか  
も MAC が 1 コピーのみ存在する状態を維持できる (後述の実施例を参照)。

最終的に得られる形質転換細胞 (哺乳類細胞) が保有する MAC の数は少ないほ  
ど好ましく、核あたり一つの MAC を保有していることが特に好ましい。本発明の  
20 作製方法によれば、効率的に核あたり一つの哺乳類人工染色体を保有する形質転  
換細胞を得ることが可能である。

本発明の他の局面は、以上 の方法によって作製される哺乳類人工染色体 (MAC)  
を保有する形質転換細胞 (形質転換体) を提供する。かかる形質転換細胞は MAC  
25 を他の細胞に移入する際の供給源として利用することができる。また、それ自身

を生体に導入するなど、哺乳類人工染色体を生体内に導入するための運搬体として利用することもできる。

(哺乳類人工染色体の性質)

5 本発明において構築される哺乳類人工染色体（MAC）は以下の性質を備える。即ち、(1) 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列（目的遺伝子及びその制御領域をコードする配列又は所望の配列を挿入するための挿入用配列）を有する、(2) 哺乳類細胞中で複製される、(3) 宿主細胞の染色体外に維持される、(4) 細胞分裂の際に娘細胞に伝達される、及び(5) 環状又は線状である。MAC の形態は、環状ベクター（BAC 又は PAC）を前駆体として作製した場合はテロメア配列を含まないために環状となる。他方、線状ベクター（酵母人工染色体）を前駆体として作製した場合は、十分に機能するテロメア配列がその両端に備えられれば線状形態をとり、それ以外の場合には環状形態をとるものと考えられる。尚、哺乳類複製起点は哺乳類セントロメア配列内に存在していてもよい。

15

以上の諸性質を備えることにより、本発明の MAC はそれが導入される哺乳類細胞内で染色体として機能しつつ、細胞分裂の際に実質的な構造変化を伴うことなく娘細胞へと適切に分配されて維持される。

また、本発明の MAC では所望の目的遺伝子をその制御領域とともに保持させることができる、目的遺伝子を導入細胞内で効率よく発現させることができる。尚、後述の実施例で示されるように、目的遺伝子として GCH1 遺伝子を使用した例において、染色体上に存在している場合と同様の発現制御が実現されている。

25 本発明の哺乳類人工染色体は、哺乳類細胞以外の細胞（例えば酵母細胞、大腸菌などの細菌）で自律的に複製し分配されることを可能にする DNA 配列を有して

いてもよい。このような DNA 配列を有することにより、本発明の MAC は哺乳類細胞以外の細胞においても染色体として機能する。従って、本発明の MAC をシャトルベクターとして利用し得る。

5 哺乳類セントロメア配列は CENP-B box 配列を含んでいることが好ましい。CENP-B box を高頻度に有する領域を含んでいることが特に好ましい。さらには、哺乳類セントロメア配列がヒト 21 番染色体のアルファサテライト領域由来の配列、特に  $\alpha$  21-I アルフォイド領域の配列を含んでいることが好ましい。

10 後述の実施例に示されるように、本発明者らは BAC を前駆体として用いた系においてヒト GCH1 (EC 3.5.4.16; GCH1) をコードする約 180kb の遺伝子を発現可能に保持するヒト人工染色体 (human artificial chromosome: HAC) の作製に成功している。ヒト GCH1 遺伝子の一つは染色体上で 14q22.1-q22.2 に位置し、60kb 以上に亘る 6 個のエクソンから構成される (図 1) (Ichinose et al. 1995; Hubbard et al. 2001)。GCH1 は後述の各種酵素反応での必須コファクターであるテトラヒドロビオプテリンの生合成経路における第 1 段階酵素であり、種々の高等生物に存在している (Nichol et al. 1985; Tanaka et al. 1989; Werner et al. 1990)。テトラヒドロビオプテリンは GCH1、6-ピルボイル-テトラヒドロブテリニン合成酵素 (EC 4.6.1.10; PTPS) 及びセビアブテリン還元酵素 (EC 1.1.1.153 SR) による三段階の反応によって GTP から合成される。これらの酵素の中で主要な制御ポイントは GCH1 であって、その発現は転写段階においてはサイトカイン誘導の支配下にあり (Werner et al. 1993)、翻訳後段階においてはフィードバック制御タンパク質である GFRP の支配下にある。テトラヒドロビオプテリンは芳香族アミノ酸ヒドロキシラーゼ、即ち、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ (EC 1.1.4.16.2; PAH)、ドーパミン合成における第 1 段階かつ律速酵素であるチロシンヒ

ドロキシラーゼ (EC 1.14.16.3; TH)、セロトニン生合成に関与するトリプトファン 5-ヒドロキシラーゼ (EC 1.14.16.4; TPH) のナチュラル・コファクターとして機能する。テトラヒドロビオブテリンは一酸化窒素合成酵素 (NOS) の三つの分子形のすべてに必須でもある (Kaufman 1993)。GCH1 活性、テトラヒドロビオブテリンレベル、及び／又は TH 活性の低下が黒質線状体 (*nigrostriatum*) ドーパミンニューロンにおけるドーパミン欠乏の原因となり、そして遺伝的ドーパ応答性ジストニー (*dopa-responsive dystonia*: DRD、セガワ症候群) (Ichinose et al. 1994) やパーキンソンズムのようないくつかの有名な臨床的症状を引き起こす。したがって、その真の制御領域を含んだ GCH1 遺伝子を保持する哺乳類人工染色体は GCH1 遺伝子の欠損を修復することに間違いなく有用であって、同時に *in vivo* における GCH1 の複雑な制御メカニズムについての詳細な研究を容易にするであろう。

(哺乳類人工染色体の移入)

15 哺乳類人工染色体 (MAC) の哺乳類細胞への導入は例えば次の方法で行うことができる。

まず、MAC を保有する宿主細胞から MAC を分離し、分離された MAC を哺乳類細胞 (ターゲット細胞) に導入する。MAC の分離は、例えば次の方法によって行うことができる。まず MAC を保有する宿主細胞の懸濁液を調製し、そして核酸成分を抽出する。その後フィコールなどを用いた密度勾配遠心法によって染色体が含まれる画分を取得する。続いて、フィルター等を用いて分子量の小さい人工染色体を分離する。

20 分離された MAC を哺乳類細胞へ導入する方法としてはリポフェクション、リン酸カルシウムを利用したトランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポーレーションなどから適宜好適な方法を選択することができる。

細胞融合を利用した以下 の方法で MAC を 哺乳類細胞へ導入することもできる。まず、MAC を保有する宿主細胞と微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させ、続いて融合細胞の中から微小核形成能を有し且つ MAC を保有するハイブリッド細胞（雑種細胞）を選択する。ここで、微小核形成能を有する哺乳類細胞としては、  
5 例えばマウス A9 細胞（American Type Culture Collection, Manassas, VA 2011  
0-2209）、マウス ES 細胞、CHO 細胞等を用いることができる。細胞融合は PEG (Polyethylene Glycol) を用いて行うことができる。目的のハイブリッド細胞の選択  
は、マウス A9 を使用した場合を例に採れば、融合に使用した宿主細胞に特異的な  
10 選択マーカーとウワバインとを利用した選択培養によって行うことができる。

次に、選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる。一般的にはコルセミド処理をして微小核多核細胞を形成させ、続いてサイトカラシン B 処理及び遠心処理をして微小核体を得る。

15 微小核体は、PEG を利用した融合法等によって哺乳類細胞（ターゲット細胞）と融合される。以上の工程によって哺乳類細胞への MAC の移入（導入）が行われ、MAC を保有する哺乳類細胞が得られる。

ここでのターゲット細胞としては、ヒト又は非ヒト哺乳動物（マウス、ラットなど）の特定組織を形成する細胞（線維芽細胞、内皮細胞、心筋細胞）、生殖細胞（受精卵を含む）、胚性幹細胞（embryonic stem cell : ES 細胞）、胚性生殖細胞（embryonic germ cell : EG 細胞）、組織幹細胞（造血系幹細胞、間葉系幹細胞、神経系幹細胞、骨系幹細胞、軟骨系幹細胞、上皮系幹細胞、肝幹細胞など）などが用いられる。これらの幹細胞に対して特定の組織の細胞へと分化するように誘導処理を施した細胞をターゲット細胞として用いることもできる。このようなタ  
20 ゲット細胞としては、例えば神経系幹細胞に血小板由来増殖因子（PDGF）、毛様  
25 などの増殖因子を組み込んだ細胞等が挙げられる。

体由来神経栄養因子 (DNTF) 及びトリヨードサイロニン (T<sub>3</sub>) を用いてそれぞれニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトへと分化誘導した細胞、間葉系幹細胞にデキサメタゾン及びアスコルビン酸などを用いて骨芽細胞へと分化誘導した細胞、間葉系幹細胞を TGF- $\beta$  の存在下で培養して軟骨細胞へと分化誘導した細胞が挙げられる。

本発明の MAC を導入する細胞として、魚類（メダカ、ゼブラフィッシュなど）、両生類（アフリカツメガエルなど）、鳥類（ニワトリ、ウズラなど）など、哺乳類以外の脊椎動物の細胞を用いることもできる。

10

ターゲット細胞への MAC の移入は *in vitro*、*in vivo* 又は *ex vivo* で行われる。例えば生体内の細胞に対して直接、哺乳類人工染色体 (MAC) の移入を行うことにより、又は生体外で MAC を移入した細胞を生体に導入することにより、生体を構成する所望の部位（例えば、心臓、肺等の特定の組織）に MAC を導入できる。その結果、導入部位において MAC に保持された機能配列からの発現が行われる。このように、MAC を外来遺伝子を生体内へと導入するためのベクターとして利用できる。MAC はクローニング許容サイズが大きいことから、特に制御領域を含む大きな外来遺伝子を導入するためのベクターとして好適に利用することができる。

20 より具体的には、本発明の哺乳類人工染色体 (MAC) は例えば遺伝子治療用のベクターとして利用され得る。即ち、欠損遺伝子の機能補填を目的として外来遺伝子を導入することや、異常遺伝子の発現を抑制又はその発現産物の作用を抑制する目的で外来遺伝子を導入すること等に本発明の MAC を利用することができる。本発明の MAC はそれを導入した細胞内で安定して維持されることから、導入遺伝子が安定的、かつ長期的に発現され、優れた治療効果が期待される。また、本発

明の MAC を利用すれば制御領域を含んだ、サイズの大きな外来遺伝子を導入可能であるから、それを導入した細胞内で本来の制御領域に支配された遺伝子発現を行うことができる。この観点からも優れた治療効果が期待される。

5 また、本発明の MAC は所望の遺伝子の機能又はその作用メカニズムを解明するための手段をも提供する。特に、サイズが大きいがために従来のベクターでは遺伝子導入を行うことができなかった遺伝子の機能又は作用メカニズムを解明するための手段を提供する点で有用である。即ち、機能が未知の又は作用メカニズムが未知の遺伝子の研究手段も提供する。特に本発明の MAC は、外来遺伝子をその  
10 本来の制御領域に支配された発現が可能なように保持できることから、組織特異的発現機構の解析や、マウスなどモデル動物個体に導入したヒト遺伝子の発現解析、阻害剤や促進剤の開発などに威力を発揮すると考えられる。

後述の実施例で示されるように、本発明者らは、ES 細胞を利用して上記本発明  
15 の哺乳類人工染色体（MAC）が導入されたマウス個体（キメラマウス）の作出に成功した。尚、XY 核型の ES 細胞を用いたキメラマウス（オス）の作出に加え、XO  
核型の ES 細胞を用いたキメラマウス（メス）の作出にも成功した。これによって、  
本発明の哺乳類人工染色体を形質転換動物の作出にも利用できることが確認され  
た。このような成果に基づいて本発明の他の局面では、哺乳類人工染色体が導入  
20 されてなる非ヒト形質転換動物及びその作出方法が提供される。本発明における  
非ヒト形質転換動物にはマウス、ラット等の齧歯目動物が含まれるがこれらに限  
定されるものではない。

本発明の非ヒト形質転換動物はその発生段階で MAC を導入することにより作出  
25 される。作出方法としては、ES 細胞を利用する方法や受精卵の前核に直接核酸コ

ンストラクト (MAC) の注入を行うマイクロインジェクション法などを用いることができる。以下、本発明の非ヒト形質転換動物の作出方法の具体例として、マウス ES 細胞を用いた方法を説明する。この方法ではまず、MAC を保有する ES 細胞を調製する。かかる ES 細胞の調製は上述の微小核融合法を利用して行うことができる。

5 即ち、まず所望の構成の MAC を保有する細胞（例えば HT1080）を用意し、これを微小核融合能を有する細胞（例えばマウス A9 細胞）に融合して MAC の移入を行う。その後、適切に MAC が移入された細胞からコルセミド処理等によって微小核を形成させる。得られた微小核を、PEG などを利用して ES 細胞と融合させる。

10 そして融合細胞の中から MAC を保有するものを選択する。以上のようにして調製された MAC 保有 ES 細胞をマウスの胚盤胞（プラストシスト）に導入する。即ち、まず交配後の雌マウスから卵巣ごと子宮全体を取り出した後、子宮内より胚盤胞を採取し、この胚盤胞の胚胞腔内にマイクロインジェクションによって MAC 保有 ES 細胞を導入する。続いてインジェクションの終了した胚盤胞を子宮偽妊娠マウス（仮親）に移植し、自然分娩又は帝王切開により仔マウス（胎仔）を得る。

15 尚、得られた仔マウスに MAC が導入されていることは、仔マウスの毛色の観察や、使用した MAC に特異的な配列を有するプローブを用いた DNA 解析などによって確認できる。

#### <実施例 1> アルフォイド-BAC の構築

20 Bello-BAC の XbaI サイトに MluI-SfiI-SacII リンカーを挿入して pBAC-TAN を作製した。pBAC-TAN の NotI-HindIII サイトに、ともにプラスチシジン (Blasticidin)S 耐性遺伝子を含む断片である、pCMV/Bsd (インビトロゲン) の NotI-HindIII 断片 (1.3kb) 又は pSV2bsr (科研製薬) の PvuII-EcoRI 断片 (2.6kb) を挿入することにより pBAC-CMV と pBAC-SV を作製した。LL21NC02 ライブライリー 25 (Lawrence Livermore Laboratory) から得られたコスミドクローンである Q25F12

を *Sfi*I 消化及び pBAC-TAN の *Sfi*I サイトへクローニングすることによって約 25kb の  $\alpha$  21-I アルフォイド断片 ( $\alpha$  25: 配列番号 3) を単離した。その結果得られた、  
アルフォイド配列がタンデム状に配列されてなる 50kb 又は 100kb のアルフォイド  
インサートを含んだアルフォイド-BAC を *Mlu*I 及び *Sac*II で消化し、続いてアル  
5 フォイド断片を pBAC-CMV 又は pBAC-SV の *Mlu*I-*Sac*II サイトにそれぞれ挿入する  
ことにより、50kb 又は 100kb のアルフォイド断片を含むアルフォイド-BAC である  
SV/ $\alpha$  50 及び CMV/ $\alpha$  100 を構築した (図 3)。

#### <実施例 2> GCH1 遺伝子座を含む HAC の形成

ヒト 21 番染色体由來の 11 量体高次繰り返しユニット (11 monomer repeating units: モノマー繰り返しユニット) (Ikeno et al. 1994) からなる  $\alpha$  21-I アル  
10 フォイドを HT1080 細胞に導入することによって効率的に HAC を作製することが可  
能である (Ikeno et al. 1998)。本実施例ではアルフォイド-BAC 及び GCH1-BAC  
を利用して、GCH1 遺伝子座を含み、正常に制御された遺伝子発現をする複数の HAC  
15 を作製した。本実施例で使用した BAC を図 3 に示した。CMV/ $\alpha$  100 は 100kb の  $\alpha$   
21-I アルフォイド配列と選択マーカーとしての CMV-Bsd を含み、そして SV/ $\alpha$  50  
は 50kb の  $\alpha$  21-I アルフォイド配列と SV2-Bsr 選択マーカーを含み、上述の方法  
でそれぞれ構築された。GCH1-BAC は BAC ライブラリー (Genome systems) から取  
得され、それは GCH1 遺伝子を含む 180kb のゲノム DNA 断片を有する。尚、BAC-DNA  
20 の精製は CsCl 密度勾配遠心法により行った。

いずれかのアルフォイド-BAC と GCH1-BAC をモル比で 1:1 となるように HT1080  
細胞にリポフェクションでコトランスフェクトし、形質転換細胞を選択した。具  
体的には、リポフェクタミン (ギブコ BRL) を使用して 0.5  $\mu$ g のアルフォイド  
-BAC と 1.0  $\mu$ g の GCH1-BAC (186L09、ゲノムシステム) を HT1080 ( $5 \times 10^5$ ) にコ  
25 トランスフェクションした。尚、この操作は製品使用説明書に従って行った。形

質転換した細胞を  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  のプラスチシジン S (BS、科研製薬) で選択し、10日後にコロニーを採取した。

染色体外分子として HAC が存在していることを検出するために、 $\alpha$  21-I アルフ  
5 ォイド DNA と BAC ベクターをプローブとして用いた FISH 法で BS-耐性細胞株を分  
析した。具体的には、メタノール／酢酸 (3:1) による固定化後のメタフェイズ・  
スプレッド (分裂中期染色体) をスライドガラス上に調製し、常法にしたがって  
FISH を行った。HAC を検出するために、プローブとしてビオチン標識  $\alpha$  21-I アル  
10 フォイド DNA (11-4) (Ikeda et al. 1994) 及びジゴキシゲニン標識 Belo-BAC を  
用いた。この二色 FISHにおいてはビオチン標識 DNA を FITC 結合アビシンによっ  
て可視化し、他方ジゴキシゲニン標識 DNA を TRITC 結合抗ジゴキシゲニン (ペー  
15 リンガー マンハイム) によって可視化した。ツアイス顕微鏡に設置した CCD カ  
メラを用いて写真撮影した。IPLab 及び Adobe Photoshop 6.0 を用いてイメージ  
加工した。

15

FISH の結果、CMV/ $\alpha$  100 及び GCH1-BAC のコトランスフェクションによって得ら  
れた 16 の形質転換細胞株の中の 1 つ (HT/GCH2-10)、及び SV/ $\alpha$  50 及び GCH1-BAC  
のコトランスフェクションによって得られた 17 の形質転換細胞株の中の 3 つ(そ  
の中の一つは HT/GCH5-18) は、分析した細胞の 95% 以上において HAC のコピーを  
20 核あたり一つ有していた。残りの細胞株では、導入された BAC が HT1080 の染色体  
に組込まれるか、又は FISH 解析においてシグナルが検出できないものであった。

構築された HAC が GCH1 遺伝子のゲノム断片を含むか否かを検討するために、HAC  
を含む 4 つの細胞株に対して GCH1 遺伝子のエクソン 1 及びエクソン 4~6 に対す  
25 るプローブ (図 3) をハイブリダイズさせた。エクソン 1 用のプローブにはエク

ソン 1 を含む 13kb のビオチン標識断片を、エクソン 4~6 用のプローブにはエクソン 4、5 及び 6 を含む 8kb のジゴキシゲニン標識断片を用いた。

CMV/α 100 及び GCH1-BAC のコトランスフェクションによって得られた  
5 HT/GCH2-10 細胞株内の HAC 上、及び SV/α 50 及び GCH1-BAC のコトランスフェクションによって得られた HT/GCH5-18 細胞株内の HAC 上において両プローブのシグナルがそれぞれ検出された（図 4）。これらの HAC 上に検出された GCH1 シグナルは HT1080 の染色体上の内在性遺伝子のそれよりも強いものであった。HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 のいずれにおいても導入遺伝子が HT1080 の染色体内に組込まれたのは少數の細胞（5%未満）であったので、これらの細胞株は核あたり一コピーの HAC を保有するようにサブクローニングして、それ（サブクローニングした細胞株）を更なる検討の対象として用いた。

15 <実施例 3> HAC のセントロメア／キネトコア構造及び有糸分裂における安定性

HAC のセントロメア／キネトコア構造を調べるために、必須セントロメア／キネトコアタンパク質である CENP-A 及び CENP-E (Palmer et al. 1991; Yen et al. 1991; Howman et al. 2000) の存在を HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 のメタフェイズ・スプレッドを用いて間接免疫蛍光法で調べた。尚、間接免疫蛍光法は次のように行った。まず、低張処理及び 1% パラホルムアルデヒド固定化細胞を抗 CENP-A 抗体 (Ando et al. 2002) 又は抗 CENP-E (Santa Cruz) 抗体とともにインキュベートした。各抗体の局在については FITC 結合抗マウス IgG で可視化した。次の FISH 解析分析のために、処理後の細胞を 1% パラホルムアルデヒドで固定し、続いてメタノール／酢酸（3:1）で固定した。

25 間接免疫蛍光法による分析の結果、一対の姉妹染色分体に対応して対を形成す

るよう CENP-A シグナル及び CENP-E シグナルが各 HAC 上に検出され、そしてそのようなシグナルはすべての内在性染色体のセントロメアにおいても同様に検出された（データ示さず）。

5 次に、選択を行わない条件下における HT/GCH2-10 細胞株及び HT/GCH5-18 細胞株が保有する HAC の有糸分裂における安定性を検討した。HAC の安定性は、それを保有する細胞を非選択条件下で約 30 日間培養することにより評価した。具体的には、BS 選択を行わない条件下、培養 10 日後、20 日後及び 30 日後の各細胞株からメタフェイズ・スプレッドを調製し、HAC の存在を FISH で分析した。サンプル 10 日毎に各細胞株から調製された 50 個の伸展染色体を分析し、HAC を保有する細胞の割合を決定した。HAC の損失割合は次の式によって計算した。即ち、 $N_n = N_0 \times (1-R)^n$ 、但し、 $N_0$  は選択条件下において HAC を保有するメタフェイズ・スプレッドの数、 $N_n$  は非選択条件下、培養  $n$  日後において HAC を保有するメタフェイズ・スプレッドの数である。尚、FISH 解析は上述の方法と同様に行った。

15 非選択条件下、培養 30 日後において、HT/GCH5-18 の分裂中期細胞の 95%が、また HT/GCH2-10 の分裂中期細胞の 80%が HAC を保有しており、HAC のコピー数が非選択条件下で一つに維持された。いずれも細胞株においても宿主染色体への組み込みは観察されなかった。非選択条件下、培養 30 日後において HAC を保有する細胞の割合を基に一日当たりの染色体損失を算出した。HT/GCH5-18 及び HT/GCH2-10 におけるその値は、それぞれ 0.2% 及び 0.5% であった。これらの結果は、各細胞株において HAC 上に活性のあるセントロメア／キネトコア構造が形成され、各 HAC が有糸分裂を通して安定に維持されたことを示すものである。

25 <実施例 4> HAC の DNA 構造

HT/GCH2-10 内及び HT/GCH5-18 内の各 HAC が環状であるか線状であるかを決定するために、プローブとしてテロメア配列及び BAC ベクターを用いて FISH を行つた。HAC 上にテロメアシグナルは検出されず、他方で BAC ベクターのプローブでは染色された。これに対して、宿主細胞である HT1080 由来の染色体の末端ははつきりとした斑点状に染色された。予想された通り、BAC 由来 HAC は環状構造であると考えられた。

次に、HT/GCH2-10、HT/GCH5-18、及びトランスフェクションを行っていない HT1080 細胞からそれぞれ単離した DNA を制限酵素処理することにより HAC の DNA 構成を分析した。各ゲノム DNA サンプル ( $5\mu\text{g}$ ) を BamHI 又は *Sst*I で 4 時間消化した後、常法に従ってゲル電気泳動に供した。そしてゲル内の DNA をナイロン膜に転写した後、GCH1 エクソン 6 (2.1kb) から調製された  $^{32}\text{P}$  標識 DNA プローブ (エクソン 6 プローブ) 及び GCH1 の上流領域 (1.4kb、GCH1-BAC での位置 595-1959) から調製された  $^{32}\text{P}$  標識 DNA プローブ (US プローブ) をハイブリダイズさせた。

15

その結果、US プローブによって検出された BamHI 断片のサイズは、内在性 GCH1 遺伝子由来のものが 5.0kb、GCH1-BAC 由来のものが 3.5kb であった。これら 5.0kb 及び 3.5kb 断片は HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 から調製された DNA においてほぼ等しいシグナル強度で検出された (図 5 (A))。一方、エクソン 6 プローブによつて検出された *Sst*I 断片のサイズは、内在性 GCH1 由来のものが 24.5kb、GCH1-BAC 由来のものが 14.4kb であった。これら 24.5kb 及び 14.4kb 断片は HT/GCH5-18 から調製された DNA においてほぼ等しいシグナル強度で検出されたが、一方で HT/GCH2-10 から調製された DNA については内在性 GCH1 由来の断片に加えてサイズが異なる 3 種類の断片が検出された (図 5 (B))。これらの結果は、本実施例において使用した HT1080 細胞の核型が 3n であるので、HT/GCH5-18 内の GCH1 保有

HAC がトランスフェクトされた GCH1-BAC DNA の約 3 コピーの集合によって構築されたことを示唆するものであり、一方で HT/GCH2-10 では GCH1 エクソン 6 の末端領域において再配列が生じ、しかし US プローブによって認識されたバンドの強度によって判断されるように、おそらく GCH1-BAC を 3 コピー保有していることを示すものである。HT/GCH2-10 内の GCH1 転写産物を RT-PCR で分析したところ、GCH1 遺伝子の内部再配列が確認された（データ示さず）。

HT/GCH2-10 と HT/GCH5-18 内の GCH1-BAC 及びアルフォイド BAC のコピー数を GCH1 エクソン 6 及び BAC ベクターをそれぞれプローブとして用いたドットハイブリダイゼーションによって決定した。HAC に含まれる各 BAC の相対コピー数についてはハイブリダイゼーションのシグナル強度値から推定した。ここでの各シグナル強度値については各 DNA プローブを用いて決定し、0.1ng の GCH1-BAC DNA のシグナル強度値を基準にして標準化した（図 6）。GCH1 エクソン 6 をプローブとして用いた場合には、HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 から調製された DNA では 0.5 μg で、また HT1080 から調製された DNA では 1 μg で 0.1ng の GCH1-BAC DNA と等しいハイブリダイゼーション強度値を示した（図 6 左欄）。本研究で使用した HT1080 の核型が 3n であるので HT1080 の染色体内において GCH1 遺伝子が 3 コピー存在し、そして HT1080 から調製した DNA のシグナル強度値と等しい値が HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 から調製した場合には半量の DNA で得られたという結果を考えれば、HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 は GCH1 遺伝子を 6 コピー（即ち、染色体上及び HAC 上にそれぞれ 3 コピー）含有しなければならない。BAC の合計コピー数を BAC ベクタープローブを用いて得られた強度値から推定した。HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 から調製された DNA では 0.33 μg で 0.1ng の GCH1-BAC DNA と等しいハイブリダイゼーション強度値を示した。一方予想されたように、HT1080 から調製された DNA ではシグナルが検出されなかった（図 6 右欄）。それ

故に、両 HAC は GCH1 遺伝子のコピー数のおおよそ 3 倍の BAC ベクターのコピー数を有する。したがって、全 BAC ベクターのコピー数は細胞あたり約 9 のはずである。即ち、GCH1 遺伝子の 3 コピーは GCH1-BAC のかたちで存在し、BAC の残りの 6 コピーは両 HAC においてアルフォイド BAC のかたちで存在しているはずである。

5

#### <実施例 5> HAC 保有細胞株のマウス A9 細胞への導入

クローニングしたアルフォイド DNA を使用することによる、HAC の *de novo* 形成がヒト線維芽細胞株である HT1080 内で成功している。神経細胞株における GCH1 遺伝子の正常な発現を確認するためには、HT1080 内に構築された HAC を神経細胞株内に導入する必要がある。

微小核体介在性染色体導入 (MMCT) (Fournier et al. 1997) を可能とするために HAC 保有細胞株 (HT/GCH5-18) とマウス A9 細胞株を PEG を用いて融合した。即ち、HAC 保有細胞株 ( $5 \times 10^5$ ) 及びマウス A9 細胞 ( $5 \times 10^5$ ) を共培養し、そして PEG/DMSO 溶液 (シグマ) 内で融合させた。続いて BS 及びウワバイン (Ouabain) 耐性細胞を 15 それぞれ BS ( $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) 及びウワバイン ( $3 \mu\text{M}$ ) で選択し、BS 及びウワバイン 耐性細胞株を FISH で分析した。HAC 及びヒト染色体を同定するためにそれぞれ BAC ベクタープローブ及び Alu 反復配列プローブをメタフェイズ・スプレッドにハイブリダイズさせた (図 7 (A))。結果、融合細胞株の一つである F/GCH5-18 は 8-10 個のヒト染色体とともに HAC のコピーを 1 又は 2 以上含んでいた。

20

各融合細胞内の HAC は非選択条件下で有糸分裂を通して安定して維持され、一日あたりの染色体損失は約 1% であった (データ示さず)。マウス細胞株内のヒト染色体の有糸分裂における安定性は時として、マウス染色体のセントロメアに位置し、機能的セントロメア配列として作用すると考えられているマイナーサテライト DNA を融合に供されるマウス細胞から獲得することによって得られる

(Shen et al. 1997)。そこで、HAC 上のマウスマイナーサテライト DNA の存在の有無を FISH で調べた。HAC 上にマイナーサテライト DNA のシグナルは検出されず、一方でマウス染色体のセントロメアでは強いシグナルが検出された（図 7 (B)）。  
融合細胞株はコルセミド処理の条件で微小核体（マイクロセル）を形成すること  
5 が可能であった（データ示さず）。それ故に、HAC は神経細胞株に導入可能であると考えられる。

#### <実施例 6 >

HAC が保有する大きなゲノム断片内の導入遺伝子からの正常に制御された遺伝子発現が期待された。HAC 形成に使用された GCH1-BAC は GCH1 エクソン 1 の 5' 側上流領域から始まる 100kb を越えるゲノム配列を含んでいた。そこで、HT1080 及び HAC を保有するその派生株における GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH1) 活性を測定した。先の報告によれば、線維芽細胞株における GCH1 活性はほとんど検出されないが、IFN- $\gamma$  の誘導によってその活性は上昇するであろうと予測された  
10 (Werner et al. 1990)。そこで、HT1080、HT/GCH2-10 及び HT/GCH5-18 における GCH1 活性を IFN- $\gamma$  の存在下及び非存在下で分析した（図 2）。尚、GCH1 活性の測定手順は次の通りとした。IFN- $\gamma$  非含有又は含有 (250U/ml) の培養液を用いて  
15 48 時間各細胞を培養した。培養後の細胞をトリプシン処理し、その後 PBS (phosphate-buffered saline) で洗浄し、続いて 0.3M KCl、2.5mM EDTA、及び  
20 10%グリセロールを含む 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した。GCH1 活性の測定は既述の方法 (Hibiya et al. 2000) に従った。

GCH1-HAC を保有しない HT1080 では IFN- $\gamma$  誘導をしない条件において GCH1 活性はかろうじて検出できるレベルであった。一方、その活性は IFN- $\gamma$  の添加によつ  
25 て 15 倍に上昇した。HT/GCH2-10 細胞株では IFN- $\gamma$  誘導をしない条件において、

HAC を保有しない HT1080 の検出値の 3 倍の GCH1 活性が認められた。IFN- $\gamma$  誘導後は 30 倍近くの活性の上昇がみられた。これに対して HT/GCH5-18 では IFN- $\gamma$  の非存在下において GCH1 活性は 70 倍にまで上昇し、IFN- $\gamma$  を添加することで更に約 5 倍の活性の上昇がみられた。いずれの HT/GCH-HAC 細胞株においてもその程度  
5 は異なるものの GCH1 活性の上昇が認められ、これは染色体構造及び／又は HAC 内の DNA 再配列における相違を反映したものであると考えられる。また、両 HT/GCH-HAC 細胞株は依然として IFN- $\gamma$  誘導に感受性であって、それは真の染色体上の GCH1 遺伝子の発現における応答性と同様であった。

10 以上の実施例で示したように、アルフォイド-BAC 及び GCH1-BAC を約 1 : 1 の DNA 割合で用いた簡易なコトランスフェクション法によって、GCH1 遺伝子 (GCH1-HAC) を含む大きな DNA 断片を含有した HAC を得ることに成功した。この GCH1-HAC はテロメアを含まない環状構造にも拘わらず、非選択条件下、30 繼代以上その後においても 1 コピーが存在する状態に維持された。これは HAC が細胞周期  
15 ごとに一度複製され、そして正確に娘細胞に分配されることを示唆するものである。HAC はサイズがメガベース (cytologically megabases in size) であって、トランスフェクトされた BAC DNA よりも約 10 倍大きい。

HAC の特性及びその de novo 形成のメカニズムを調べるために HAC の DNA 構造  
20 を分析した。BAC コンストラクトではレアカッター（制限酵素）切断部位のほとんど全てがメチル化されること、及び使用される細胞株が内在性の GCH1 遺伝子座を含むことから、GCH1 遺伝子の全領域を対象とした制限酵素分析は困難であった。それ故に、我々は BAC ベクターと GCH1 遺伝子座との連結部位に相当する領域を対象に制限酵素分析を行った。その結果、得られた二つの細胞株内の GCH1-HAC はその構成分子として GCH1-BAC を 3 コピーとアルフォイド-BAC を 6 コピー含有して

いた（図 5、6）。HAC 形成の正確なメカニズムは不明であるが、GCH1-HAC は導入した DNA の多量体から構成され、これは導入分子としてアルフォイド-YAC 又はアルフォイド-BAC のみ（データ示さず）を用いて形成された HAC(Ikeno et al. 1998) に類似するものであった。HAC の形成の際に別個の BAC の会合（集合）を伴うと 5 いう事実は、BAC 分子の多量体化が BAC DNA 自身の増幅に加えて非特異的組換えに媒介され得ることを示唆した。

大きなヒトゲノム DNA を含む HAC の形成については、過去に 140kb 又は 162kb の HPRT 遺伝子座を使用した例が報告されている（Grimas et al. 2001; Mejia et 10 al. 2001）。彼らは相補性に依存する HAT 培地内において HPRT 遺伝子欠損 HT1080 細胞株内に HPRT 遺伝子を含む HAC を得ている。組織及びステージ特異的な発現をする遺伝子（即ちハウスキーピング遺伝子ではない遺伝子）に対してはこのようなアプローチの HT1080 細胞における実現性は低いであろう。本実施例によれば BAC に挿入された 50kb 程度の小さな  $\alpha$  21-I アルフォイド DNA によって HAC（セン 15 トロメア／キネトコア）を形成できることが示され、一方で 50% の HAC が導入遺伝子を含んでいたことから、選択マーカーを有しない大きな導入遺伝子を含有する BAC を効率的に HAC に組込むことができる事が示された。したがって、50kb のアルフォイド DNA を含むアルフォイド-BAC と、直ちに利用可能な BAC ライブライ 20 リーをそのまま利用することにより、大きな所望のゲノム領域を含む HAC を形成することが可能であるといえる。導入遺伝子が完全な状態であることは HAC の形成の後に確認されるであろう。

CMV プロモーター支配下の Bsd 遺伝子を有する形質転換細胞の選択は BS 耐性細胞の数を増加させるが、HAC 又は宿主染色体上への組込みに対する FISH シグナル 25 は多くの形質転換細胞で検出されなかった（図 1）。アルフォイド及び BAC ベクタ

一配列をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーション分析によって、これらの細胞株は染色体のみに組込まれた *Bsd* 遺伝子を保有することが示唆された。したがって、高発現プロモーターによって発現される様に組込まれた選択マーカーは、HAC 保有細胞株のスクリーニング用としては好ましいものではないと言える。

遺伝子発現は染色体構造の影響を受ける。染色体への導入遺伝子の組み込みの結果、位置効果による斑入り（PEV）（Karpen 1994）として一般に知られている現象であるジーンサイレンシングがしばしば起こる。最近の分子学的解析によって、  
10 リジン 9 上のヒストン H3 のメチル化が HP1 のクロマチンへのターゲティングの原因となり、そしてヘテロクロマチン化及び遺伝子発現の抑制が引き起こされることが報告されている（Platero et al. 1995; Bannister et al. 2001; Lachner et al. 2001）。酵母及びハエにおいてセントロメア／キнетコア又はその近隣におけるジーンサイレンシングも報告されており（Karpen & Allshire 1997）、このよう  
15 なジーンサイレンシングは哺乳類細胞でも生ずるものと予測された。最近本発明者らは、HAC のアルフォイド配列内にひとたびセントロメア／キнетコア構造が形成されると、たとえ高発現プロモーターの制御下であっても HAC 内に組込まれた短いマーカー遺伝子の発現が強く抑制されることを示した（Abe et al. 投稿中）。したがって、HAC 内で導入遺伝子を発現させようと思えば、セントロメア／キネ  
20 トコア構造との関係においてトポロジー的な問題を解決する必要がある。

HAC からの GCH1 遺伝子の発現は GCH1 遺伝子座又はその近隣のクロマチン構造と相互に関連しているのかもしれない。そこで本発明者らはセントロメア／キネトコア構造がアルフォイド配列部分にのみ形成されたのか、それとも GCH1 遺伝子座内へと拡がったのかを検証した。CENP-A は機能的セントロメア／キнетコアに

必須のタンパク質であって、セントロメア特異的ヌクレオソームのヒストン成分を構成するので (Paler et al. 1991; Howman et al. 2000)、我々は HAC のクロマチン構造を抗 CENP-A 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法 (Ando et al. 2002) で分析した。ChIP 法は次のように行った。まず、HT/GCH5-18 細胞株 ( $5 \times 10^7$ )  
5 の核を単離し、WB (20mM HEPES (pH 8.0)、20mM KCl、0.5mM EDTA、0.5mM ジチオスレイトール、0.05mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド) に溶解した。  
MNase 消化後、可溶化されたクロマチンを既述の方法 (Ando et al. 2002) に従  
い抗 CENP-A 抗体で免疫沈降した。

HeLa 細胞及び HT1080 細胞を使用したそのような分析において全免疫沈降 DNA  
10 中の 60~80%がアルフォイド配列に富んでいた。抗 CENP-A 抗体を用いた分析の結果、全免疫沈降 DNA 中において GCH1-HAC 内のアルフォイド配列は豊富に存在することが認められたが、GCH1 領域はほとんど存在していなかった。これに対してアルフォイド配列からおよそ 3kb 離れて存在する BAC ベクター配列もまた免疫沈降され、これによってアルフォイド配列部分にセントロメア／キнетコア構造が形成され、周囲のアルフォイド配列でない領域に拡がったことが示唆された (データ示さず)。セントロメア／キнетコア構造が HAC 内の GCH1 遺伝子座に侵入することは、おそらく上流制御配列に備えられる未知の制御メカニズムによって阻止されたものと考えられる。

20 GCH1 遺伝子はテトラヒドロビオブテリンの生合成経路における、第 1 段階かつ律速酵素をコードし (Nichol et al. 1985)、当該酵素は芳香族アミノ酸ヒドロキシラーゼ (PAH、TH、TPH) 及び一酸化窒素シンターゼのコファクターであって高等生物に存在する (Kaufma 1993)。GCH1 遺伝子はドーパ応答性ジストニア (DRD  
／セガワ病) (Ichinose et al. 1994) におけるドーパミン欠損の原因遺伝子である。TH 遺伝子の突然変異とともに GCH1 遺伝子の欠損が生ずると重篤な初期段階  
25

ジストニア／パーキンソンズムが引き起こされる (Ichinose et al. 1999)。

ヒト及びマウスの GCH1 遺伝子の上流制御配列についてはこれまでのところ限られた数の解析が行われたにすぎないが、CCAAT ボックス及び TATA ボックスが保存されていることが報告されている (Ichinose et al. 1995; Hubbard et al. 2002)。5 様々なげっ歯類及びヒト細胞において GCH1 遺伝子の発現が IFN- $\gamma$  によって誘導され得ることが確認されている (Werner et al. 1990)。しかしながら、IFN- $\gamma$  のシグナル伝達を含んだ正確なメカニズムは未知のままである。

10 ヒト  $\beta$  グロビン等いくつかの遺伝子の発現は、安定した組織特異的な開クロマチン構造の開始及び維持を担う遺伝子座調節領域 (LCR) によって制御されている (Festenstein et al. 1996; Milot et al. 1996)。本実施例で使用した GCH1-HAC は GCH1 遺伝子を含む 180kb のゲノム断片を保持し、それ故に組織特異的発現のため及び近隣セントロメアによる発現抑制効果を防ぐために必要な制御配列を含んでいると考えられる。上述のように、本発明者らは IFN- $\gamma$  の存在下及び非存在下において HAC からの GCH1 遺伝子の発現を GTP シクロヒドロラーゼ活性を指標に測定した (図 2)。IFN- $\gamma$  の非存在下では、HAC 保有細胞株である HT/GCH2-10 の GCH1 活性は HT1080 のそれよりもほんの少し高いものであった。また、IFN- $\gamma$  の添加によって GCH1 活性は約 30 倍上昇した。もう一つの細胞株であって HT1080 の 2 倍の数の GCH1 遺伝子を保有する HT/GCH5-18 の GCH1 活性は IFN- $\gamma$  非存在下において HT1080 のそれよりも 70 倍高いものであった。そしてその活性は IFN- $\gamma$  誘導によってさらに 5 倍上昇した。上述のように GCH2-10 HAC 上の GCH1 遺伝子のいくつかは構造的異常を有することが示唆されたので、HT/GCH2-10 と HT1080 との間の僅かな活性の相違は完全な GCH1 遺伝子のコピー数が少ないこと 20 に対応するものであると考えられる。これらの結果によって、GCH1 の遺伝子発現 25

は HAC における GCH1 遺伝子座に構築されるクロマチン構造の違いに影響を受ける一方で、GCH1 遺伝子の発現は依然として IFN- $\gamma$  に応答性を有することが示された。しかしながら、IFN- $\gamma$  誘導後の最終 GCH1 活性レベルは細胞株間で同等であった。このことは GCH1 活性を適当な範囲内に維持するための複雑な細胞内制御システムが存在することを示唆するものである。*in vivo* における GCH1 発現の複雑な制御メカニズムを理解するために GCH1-HAC は好適なシステムであると言える。

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターはヘルパーウイルス依存的増殖感染による遺伝子治療用として頻用される。AAV ベクターのクローニング許容サイズは通常、10 遺伝子発現に必要なそれ自身の制御配列を含まない cDNA を運搬するために十分なものに限られている (Dong et al. 1996)。GCH1 はチロシンヒドロキシラーゼ (TH) 及び芳香族 L アミノ酸デカルボキシラーゼ (AADC) とともに効率的なドーパミン生産に必須の酵素である。線状体において AAV からこれら三つの酵素を発現させることによって、靈長類パーキンソン病モデルにおいて比較的長期の行動回復が認められている (Muramatsu et al. 2002)。

最近、エプスタイン・バーウィルス (EBV) ベースのエピソーム状ベクターは限られた哺乳類細胞株に対して HPRT 遺伝子 (115kb) を導入する能力があり、導入された遺伝子の発現は抑止されなかったとの報告がなされた (Wade-Martins et al. 2000)。しかしながら EBV ベースのベクターは非選択条件下では HAC よりも急速に失われていき、その複製はウイルストラנסアクチベータである EBNA1 の存在に依存する。したがって、臨床的遺伝子治療における EBV ベクターの安全性についてはさらなる検討が必要である。HAC は上記の遺伝子導入用ベクターについての問題を解決し得るものであり、さらに安全性の面でも有利なものである。本実施例において大きなゲノム遺伝子座を保持した HAC は染色体外において維持され、25 調節された遺伝子発現を長期にわたって示した。それ故に TH、AADC 及び GCH1 を

含有する HAC はパーキンソン病の有望な治療戦略を提供し得る。

しかしながら、BAC を利用した HAC の *de novo* 形成がそれほど効率的に行われないこと、HAC 形成のための特定の細胞株が必要であること、及び HAC のサイズが大きいことから、細胞又は組織の必要な部位に HAC を輸送することには困難が伴う。HAC を遺伝子導入ベクターとして簡便に利用するためには HT1080 内に構築された HAC が適当な細胞株内へと導入されなければならない。HAC は微小核体（ミクロセル）の形成を可能とするマウス A9 細胞を用いた MMCT によって導入することができる (Fournier et al. 1997)。上述の実施例に示したように、本発明者らは非選択条件下で HAC の検出し得る構造変化を伴うことなく有糸分裂において HAC を安定的に維持するマウス A9 細胞株を樹立することに成功した。この HAC は A9 細胞株から他の細胞株へと容易に導入可能であると考えられる。

以上の実施例により、GCH1 遺伝子をそれ自身の制御領域とともに保持する HAC を GCH1-BAC 及びアルフォイド-BAC のコトランスフェクションによって構築できることが示された。この GCH1-HAC は制御された状態で GCH1 遺伝子を発現し、したがって *in vivo* で GCH1 の制御メカニズムを研究するための好適なシステムであることが証明された。GCH1-HAC についての更なる研究によって、セントロメア／キネトコアを構築するのに最低限必要なアルフォイド配列の数、GCH1 遺伝子の制御された状態での発現に必要な上流領域の構造、及び制御領域における転写因子の活性部位が明らかにされるであろう。本実施例で得られた結果はモデル動物又は臨床試験において将来 GCH1-HAC が遺伝子運搬ツールとして有用であることをも示すものである。

<実施例 7> 微小核融合法による HAC の ES 細胞への移入

GCH1 遺伝子を保持した HAC を含有する HT1080 細胞を細胞融合法でマウス A9 細

胞へ移入した。まず実施例 5 と同様の手順で、HAC 保有細胞株 (HT/GCH2-10) とマウス A9 細胞を融合させ、BS 耐性且つウワバイン耐性の細胞株を選択した。選択された細胞株 F(A9/2-10)4 に終濃度 0.05 $\mu$ g/ml となるようにコルセミドを加え、た後、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件で 72hr 培養した。トリプシン処理により細胞を回収し、  
5 血清を含まない D-MEM 培地に懸濁した。サイトカラシン B を 20 $\mu$ g/ml になるよう  
に加えて 37°C、5min. 放置した後、予め 37°C に保温しておいた Percoll を等量加えた。  
続いて遠心処理 (15,000rpm、90min.) を行い、微小核を回収した。回収した  
微小核を血清を含まない D-MEM 培地に懸濁した後、再び遠心処理 (2,000rpm、  
5min.) を行い、得られた沈殿 (微小核) を再度、血清を含まない D-MEM 培地に懸  
濁した。この操作を 2 回繰り返した後、微小核を含む沈殿に、トリプシン処理に  
10 より回収した ES 細胞 TT2 (C57BL/6×CBA) を加えて 1,500rpm、5min. の遠心処理  
を行い、細胞と微小核を沈殿させた。上清を捨てた後、血清を含まない 1ml の D-MEM  
培地を加えて懸濁させた。この状態で 10 分間静置 (室温) した。続いて、1,500rpm、  
5min. の遠心処理によって細胞と微小核を沈殿させ、上清を捨てた後に 1ml の  
15 PEG1500 (ロッシュ) を加えて懸濁させた。室温で 90 秒間静置した後に血清を含  
まない D-MEM 培地を 5ml 加え、遠心処理 (1,000rpm、5min.) し、細胞を回収した。

回収した細胞に血清を含まない D-MEM 培地を 10ml 加えた後、1,000rpm、5min.  
の遠心処理による洗浄を 2 回行った。洗浄後の沈殿を ESM 培地 (D-MEM+非必須ア  
ミノ酸 (Invitrogen) +0.1mM β - メルカプトエタノール +10<sup>3</sup>U/ml  
20 ESGRO (Chemicon)+ヌクレオシド) に懸濁し、得られた細胞懸濁液を、マイトイ  
シン C 処理により増殖を停止させたフィーダー細胞 SLB (角川祐造博士 (藤田保  
健衛生大学 : Fujita Health University School of Medicine) より供与) 上に播  
種した。培養開始から 24 時間経過した時点で、プラスチックサイジン S を終濃度  
25 4 $\mu$ g/ml で含む ESM 培地に交換して培養を継続した。この選択操作を開始後 5 日目

に ESM 培地 ( $4\mu\text{g}/\text{ml}$  ブラストサイジン S、 $1\times\text{HAT}(\text{Sigma})$ ) に交換し、更に 5 日間培養を継続した。

得られたコロニーを単離し、マイトイマイシン C 処理により増殖を停止させたフ  
ィーダー細胞 SLB 上 (24 穴培養皿) に播種した。増殖した細胞の中から PCR を利  
5 用して BAC DNA を保有する細胞株を選択し、アルフォイド DNA、BAC ベクター、GCH1  
遺伝子、及びマウスマイナーサテライト DNA をプローブ (実施例 2、5 を参照)  
として用いた FISH 解析に供した。

図 8 A はアルフォイド DNA 及び BAC ベクターをプローブとして用いた FISH 解析  
10 の結果である。緑がアルフォイド DNA のシグナル (矢印)、赤が BAC ベクターのシ  
グナル (矢じり) を示す。単離された ES 細胞は HAC を 1 コピー保有し、かつ正常  
核型を維持していることがわかる。

図 8 B はヒト GCH1 遺伝子のエクソン 1 領域と BAC ベクターをプローブとして用  
いた FISH 解析の結果である。GCH1 遺伝子の緑のシグナル (矢印) と BAC ベクタ  
15 ーの赤のシグナル (矢じり) が HAC 上に同時に検出された。

図 8 C はマウスマイナーサテライト DNA と BAC ベクターをプローブとして用い  
た FISH 解析の結果である。HAC 上にはマウスマイナーサテライト DNA のシグナル  
(一部を矢印で示す) が検出されなかった。尚、矢じりは BAC ベクターのシグナ  
ルを示す。

20

#### <実施例 8> ES 細胞における HAC の安定性

ES 細胞中での HAC の安定性を、選択薬剤非存在下において長期に培養すること  
により解析した。実施例 7 で得られた HAC 保有 ES 細胞をブラストサイジン S の存  
在下と非存在下で培養 (20 日間) した後、FISH 法を利用して HAC を保有している  
25 細胞の割合をそれぞれ求めた。解析結果を図 9 に示す。薬剤非存在下での長期培

養後においても 8 割以上の細胞が HAC を 1 コピーの状態で保持していた。一回の細胞分裂あたりの染色体脱落率を計算したところ 0.2% であって、HT/GCH2-10 細胞における HAC の場合とほぼ同程度の安定性を示した。尚、染色体脱落率 R は次式により求めた。

5       $N_n = N_0 \times (1 - R)^n$

<実施例 9> 酵母人工染色体 (YAC) を用いたヒト人工染色体 (HAC) の構築  
前駆体として YAC を用いてヒト 11 番染色体の  $\beta$  グロビン遺伝子群 (クラスター)  
全領域を保持するヒト人工染色体を以下の手順で構築した。使用した前駆体 YAC  
10 は次の通りである。

(9-1) 前駆体 YAC

A201F4.3 : ヒト  $\beta$  グロビン遺伝子座を有する 150kb の YAC であって、A201F4 の右腕部を改変し PGKneor が挿入されている (Keiji Tanimono, Douglas Engel より供与、Nucleic Acid Research, 27; 3130-3137)。

15      7c5hTEL : ヒト 21 番染色体アルフォイド領域由来の約 80kb のアルファサテライト配列 ( $\alpha$  21-1) 及びマーカー遺伝子の SVbsr を含み、その両端に酵母テロメア配列を備えかつその内側にヒトテロメア配列を備える人工染色体前駆体 YAC である。7c5hTEL を保有する酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* EPY 305-5b  $\alpha$  7C5hTEL) は 1996 年 8 月 14 日付で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (現在 20 は独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、〒305-8566 茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号 中央第 6 ) に寄託されており (受託番号 FERM BP-5625)、7c5hTel はこの酵母株から調製される。尚、当該酵母株の作製方法について特表 2000-517182 号公報を参照されたい。

F61 : HT1080 に pTet-OFF (CLONTECH) を導入し、G418 選択により樹立したテトラサイクリン誘導発現系細胞である。

## (9-2) 酵母人工染色体の精製

以下の手順で Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) を施行して 2 種類の酵母人工染色体 (A201F4.3 及び 7c5hTEL) をそれぞれ分離した。PFGE は Gene 5 Nabigator (Amersham Pharmacia Biotech) を使用し、0.7%アガロースゲルにおいて 0.5xTBE、180 Volt 及び 15 second pulse の条件で 15 時間行った。PFGE ゲルより分離した YAC DNA を電気泳動により 1%低融点アガロースゲルに移し、このゲルを 10mM Tris(pH 8.0), 1mM EDTA, 100mM NaCl の緩衝液に 16 時間浸漬した。YAC DNA(0.3 μg/0.3ml) に 100 μg の E.coli tRNA を加えて 70°C で 10 分間加温してゲルを融解し、続いて 30U の β agarase(Sigma)を加えて 42°C で 2h 反応させることによりアガロースを消化した。これらに PFGE を施行して 7c5hTEL (90kb) 及び A201F4.3 (150kb) のバンドを確認した (図 10A)。

## (9-3) YAC の導入

15 精製した 7c5hTEL 及び A201F4.3 を各 0.3 μg 混和した後、Superfect(Qiagen) を 60 μl 加えて穏やかに混和し、室温で 10 分間反応させた。反応後の溶液を F61 細胞に添加した。培養液 (10% FBS(Trace Scientific Ltd., Noble Park, Australia) in D-MEM:Dulbecco's Modified Eagle Medium(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA)) を 90 分後に一度交換した。72 時間後より 8 μg/ml のプラスチシジン(Blasticidin)S 添加培地で耐性株を選択的に培養し、形質転換株を分離した。 20 その結果、19 個の形質転換株が得られた。

## &lt;実施例 10&gt; 形質転換株に対する細胞遺伝学的解析

得られた形質転換株に α 21-1 プローブ (アルフォイドプローブ、配列番号 3 の 25 DNA 断片をジゴキシゲニン標識したもの) 及び YAC の腕部のプローブ (pYAC5 ベク

ター (Dr. Maynard V. Olson (Washington University)) を XbaI で切断して得られる約 8kb の DNA 断片 (配列番号 4) をビオチン標識したもの) を用いて FISH 法を施行した。その結果 1 個の形質転換株においてミニ染色体の形成が認められ、そしてこのミニ染色体に  $\alpha$  21-1 及び YAC の腕部の両方のシグナルが確認された  
5 (図 10B)。残りのクローンでは宿主染色体上にシグナルがみられるか、又は全くシグナルが検出されないかのいずれかであった。

一方、ミニ染色体が形成された形質転換株に対してヒト  $\beta$  グロビンクラスター非コード領域の互いに異なる部位をそれぞれ認識する 3 種類のプローブ (配列番号 5、配列番号 6、及び配列番号 7) を用いて FISH 法を施行したところ、ミニ染色体上に各プローブからのシグナルが示された (図 11)。尚、各プローブは A20  
10 1F4.3 を鑄型として以下のプライマーで PCR 反応 (96°C 30 秒、58°C 40 秒、72°C 10 分を 1 サイクルとした 25 サイクル) を行い、その結果增幅された DNA をビオチン標識したものである。

#### 配列番号 5 のプローブ用プライマー

15 センス : aagaccagatagtacaggcctggctac (配列番号 10)

アンチセンス : aagattattcaaggttactatgaacacc (配列番号 11)

#### 配列番号 6 のプローブ用プライマー

センス : tgctaatgcttcatctagaaacttataatccttaattc (配列番号 12)

アンチセンス : ttccactcgagccaaccaggaaattcggcagttac (配列番号 13)

#### 配列番号 7 のプローブ用プライマー

センス : gtgttaagaaggttctctagaggctcacagatagggag (配列番号 14)

アンチセンス : aagcagcacttgactcgagttttatacatgctctac (配列番号 15)

また、テロメア反復配列 (配列番号 8 の配列が繰り返されてなる約 500bp の配列) をジゴキシゲニン標識したものをプローブとして行った FISH 法ではミニ染色  
25 体上に 2 点又は 4 点のテロメアのシグナルが認められた (図 12)。

以上の結果から、アルファサテライト配列を有する人工染色体 YAC とヒト  $\beta$  グロビンクラスター全領域を有する人工染色体 YAC とを HT1080 細胞に導入することによって、ヒト  $\beta$  グロビンクラスター全領域を保持するミニ染色体（ヒト人工染色体）を構築できることが確認された。

5

＜実施例 11＞ ファイバーFISH を用いた、ミニ染色体のマクロ構造の解析

各  $1 \times 10^6$  個のマウス A9 細胞とミニ染色体保有細胞を培養皿に播種し、これに 5  
0% PEG (SIGMA) を 3ml 添加して 1 分間培養した。続いて  $10 \mu M$  のウバイン (Ouba  
in),  $5 \mu g/ml$  のプラスチシジン (Blasticidin) S を含む選択培地で培養し、ウバ  
10 バイン及びプラスチシジン S 耐性の形質転換株を取得した。上述の方法と同様に  
FISH 法を施行したところ、得られた形質転換株の中にミニ染色体を保有し、かつ  
残りの染色体がマウス由来である形質転換株の存在が認められた。この形質転換  
株に対してアルフォイドプローブ（配列番号 3）及び  $\beta$  グロビンプローブ（配列  
番号 5、配列番号 6、及び配列番号 9 の混合）を用いて FISH 解析を行った。尚、  
15 配列番号 9 のプローブは A201F4.3 を鋳型として以下のプライマーで PCR 反応 ( $9$   
 $6^\circ C$  30 秒、 $58^\circ C$  40 秒、 $72^\circ C$  10 分を 1 サイクルとした 25 サイクル) を行い、その  
結果増幅された DNA 断片をビオチン標識したものである。

センス : gtatacacatacactgaatatg (配列番号 16)

アンチセンス tgtaggctgaagacgttaaaagaaacac (配列番号 17)

20 FISH 解析の結果、アルファサテライト配列のシグナルがミニ染色体以外の染色  
体上に認められなかったため（図 13）、ミニ染色体のアルファサテライト配列に  
対するファイバーFISH 解析が可能であった。そこで、ファイバーFISH 解析を行っ  
たところ、ミニ染色体上にグロビンとアルフォイド配列の複数のシグナルが不規  
則に並んでいることが確認された（図 14）。

## &lt;実施例 12&gt; HAC からの目的遺伝子の転写量の解析

次に、 $\beta$  グロビン遺伝子を保持した HAC を保有する細胞におけるグロビン遺伝子の転写量を解析した。

実施例 9 と同様の手順で 7c5hTEL 及び A201F4.3 を白血球 K562 細胞 (ATCC CCL-243) に導入し、 $\beta$  グロビン遺伝子を保持した HAC を保有する細胞 (HAC 保有 K562 細胞) を得た。この HAC 保有 K562 細胞と、実施例 9 で得られた HAC 保有 HT1080 細胞におけるグロビン遺伝子の発現状態を、G $\gamma$  グロビンの転写量を指標として次のように解析した。尚、7c5hTEL 及び A201F4.3 の導入操作を行う前、即ち HAC を保有しない HT1080 細胞及び K562 細胞を比較対照 (コントロール) として用いた。

まず、各細胞から常法で RNA を抽出し、MMLV の逆転写酵素及び Oligo(dT)15 プライマーを用いて cDNA を合成した。このようにして得られた各 cDNA を鋳型として次のプライマーセット (G $\gamma$  グロビンのエクソン 2 及びエクソン 3) を用いた RT-PCR を施行した。

センスプライマー : gatgccataaaggcacctggatg (配列番号 18)

アンチセンスプライマー : ttgcagaataaaggcttatccttga (配列番号 19)

RT-PCR の結果を図 15 の上段に示す。尚、 $\beta$ -アクチン遺伝子に特異的な以下のプライマーを用いて同様に RT-PCR を行った結果を併せて示した。

センスプライマー : tcacccacactgtgccatctacga (配列番号 20)

アンチセンスプライマー : cagcggAACCGCTATTGCCAATGG (配列番号 21)

一方、リアルタイム PCR 法により各サンプルの G $\gamma$  グロビン遺伝子の転写量を定量した。リアルタイム PCR は ABI PRISM 7700 (ABI アプライドバイオシステムズ社製) 及び Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR kit (Cat 204143) を用いて行った。また、増幅反応に利用するプライマーとしては上記の各プライマーを用いた。

尚、各サンプルにおける $\beta$ アクチン遺伝子の転写量を求め、これを基にサンプル間の細胞数の差を補正した。

図15の下段にリアルタイムPCR法による解析結果を示す。尚、HAC非保有のHT1080の転写量を1としたときの相対値として各サンプルにおけるG $\gamma$ クロビンの転写量を表した。HACを導入したことにより、G $\gamma$ クロビンの発現量がHT1080をターゲット細胞とした場合では1.5倍となり、他方K-562をターゲット細胞として場合では5倍以上となった。このように、いずれのターゲット細胞を用いた場合においても導入されたHACからのG $\gamma$ クロビンの発現、即ちHACに保持させた外来遺伝子の発現を確認できた。特に、K-562を用いた場合においては極めて高い活性で外来遺伝子を発現できることが示された。

#### <実施例13> HAC保有マウス（キメラマウス）の作出

実施例7によって得られたHAC保有ES細胞を培養して樹立された細胞株（HAC保有ES細胞株TT2/GCH2-10）を、ICRマウス（日本クレア株式会社）から採取した8細胞期胚あるいは胚盤胞期胚にインジェクション法により注入し、ES細胞導入胚を仮親に移植した。その後、自然分娩により産仔を得た。生後24時間のマウスから各臓器（脳、心臓、胸腺、肝臓、脾臓、腎臓）を単離し、それぞれについてゲノムDNAを調製した。得られたDNAに対してFastStart Taq DNA polymerase（Roche）を用いてPCRを行い、BAC由来のDNAを検出した。用いたプライマーの配列とサイクル（反応条件）は以下のとおりである。

BAC3a プライマー：catcggtctctgtaaaaatcg（配列番号22）

CHIPBAC3b プライマー：aggaaacagcaaaactgtgac（配列番号23）

サイクル：95°C、4分×1、95°C、15秒、55°C、10秒、72°C、30秒×35、72°C、

PCR 法による解析結果を図 1 6 (b) に示す。15 匹のマウスを解析した結果、この図に示されるように 7 匹のマウスにおいて BAC DNA がすべての臓器において検出された。

5 次に、HAC 保有 ES 細胞を用いて作出了したキメラマウス個体における GCH-HAC の存在を確認するために、分裂期染色体標本を作製し FISH 解析を行った。まず、生後 24 時間のキメラマウスの頭と内臓以外の部分を PBS で洗った後に細片化し、0.05% トリプシン/1mM EDTA 存在下で 1hr, 37°C で保温した。トリプシン処理により細片から得られた細胞を遠心分離により回収し、10%FCS を含む DMEM 培地で 2  
10 回洗った。細胞を再度 10%FCS を含む DMEM 中に浮遊させ、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。コンフルエントに近く増えた状態で TN16 を加え、分裂期に同調した後に分裂期染色体標本を作製した。

アルフォイド配列と BAC ベクター配列をプローブに用いて FISH を行った結果、キメラマウス由来 (ES 細胞由来) の細胞に人工染色体 (GCH-HAC) が確認された (図  
15 1 6 (c))。尚、図 1 6 (a) は、得られたキメラマウスを示す図であり、毛色からキメラマウスであることを確認できる。

#### <実施例 1 4> HAC の X0 核型 ES 細胞への移入、及びキメラマウスの作出

実施例 7 と同様の手順で、微小核融合法によって HAC をマウス ES 細胞に移入した。実施例 7 では XY 核型マウス ES 細胞を用いたが、本実施例では X0 核型のマウス ES 細胞 TT2-F (相沢博士より供与) を用いた。微小核融合処理の後に得られた細胞を FISH 解析に供したところ、いくつかの細胞が期待通り HAC を保有していた (データ示さず)。このようにして得られた HAC 保有 ES 細胞を培養して細胞株を樹立した後、この細胞株を用いて実施例 1 3 と同様の手順でキメラマウスの作出  
25 を試みた。その結果、図 1 7 に示すように、モザイク状の毛色のキメラマウス (メ

ス) が得られた。

**<実施例 15> 遺伝子挿入部位を有する哺乳類人工染色体の構築**

遺伝子挿入部位と、インスレーター配列の候補としてのヒト  $\beta$  グロビン LCR を  
5 含む人工染色体を構築し、人工染色体におけるインスレーター配列の効果を検証  
した。

**15-1. DNA コンストラクト**

**(1) ヒト  $\beta$  グロビン LCR**

ヒト  $\beta$  グロビン遺伝子領域をカバーする YAC クローン (A201F4.3, Dr. Douglas  
10 Engel, Northwestern Univ. より供与) から 20836kb (GenBank data base NG000007  
の 4818 から 25654 まで) を pTWV229 ベクター (タカラバイオ株式会社) のマルチ  
クローニング部位にクローン化した (TWV-LCR)。

**(2) アクセプター前駆体**

pAc-lox71-bsr-pA (Dr. Yamamura, Kumamoto Univ. より供与、Kimi Araki,  
15 Masatake Araki and Ken-ichi Yamamura(1997)) の EcoRI-XbaI 1.7kb 断片を  
pSV2-bsr の EcoRI 部位に挿入して SV-bsr-lox71 を得た。SV-bsr-lox71 の ApaLI  
断片 6kb を pBeloBAC の SalI 部位に挿入して BAC-bsr-lox71 を構築した。

$\beta$  グロビン LCR (Locus control region、HS1~5 を含む) を加えた前駆体を構築  
するために、TWV-LCR の FspI 断片 20kb を BAC-bsr-lox71 の Eco065I 部位に挿入  
20 した (BAC-LCR-lox71、図 18 を参照)。尚、この前駆体 BAC-LCR-lox71 の特徴は、  
lox71 部位の 5' 側に CAG プロモーター (各種哺乳類培養細胞、マウス個体において  
安定した遺伝子発現が期待できる) が配置され、組み換えの際に、プロモーター  
を持たない (プロモーターレス) 選択マーカー遺伝子と期待通りに組み換えが  
生じた時のみ、CAG-選択マーカー遺伝子が構築され、遺伝子の発現が起こるよう  
25 になっている。

## (3) アルフォイド前駆体

CMV- $\alpha$  50(アルフォイド配列がタンデム状に配列されてなる約 50kb のアルフォイドインサート(実施例 1 を参照)を含む)の Sall-Sall(Cos, loxP 配列)を取り除いた前駆体を構築した ( $\Delta \alpha$  50)。

## 5 (4) ドナープラスミド

pGK-puro (PGK プロモーター、puro 遺伝子、PGK 遺伝子の polyA 配列、アンピシリン耐性遺伝子、複製起点 (ori) を含む大腸菌用ベクター) の HindIII-Sall 断片 1.2kb (puro 遺伝子の coding region) と lox66-Niaczeo (Dr. Yamamura, Kumamoto Univ. より供与、Kimi Araki, Masatake Araki and Ken-ichi Yamamura(1997)の HindIII-XbaI 断片 3.0kb (lox66 を含む)をライゲーションし、plox66-puroを得た。plox66-puroより SpeI-KpnI 断片 1.2 kb (lox66-puro カセット) を平滑末端化し pTWV229 の HindIII 部位に挿入した (TWV-lox-puro)。pEGFP-C1 (clontech) の Asel-MluI 断片 1.6kb を平滑末端化し、TWV-lox-puro の Sall 部位に挿入した (Dn-EGFP)。

15

15-2. Lox 部位を持つ人工染色体の構築

アルフォイド前駆体( $\Delta \alpha$  50)とアクセプター前駆体 (BAC-bsr-lox7 あるいは BAC-LCR-lox71) を HT1080 細胞に共導入し、薬剤 (bs) 耐性細胞から FISH により人工染色体を保有する細胞株を選び出した。

20

15-3. 挿入部位を持つ哺乳類人工染色体への GFP 遺伝子の挿入

lox15-13 細胞株 ( $\beta$  グロビン LCR・lox71 を持つ人工染色体を保有する、 $2 \times 10^5$ ) に 1  $\mu$ g の pCAG-Cre (Cre リコンビナーゼ遺伝子) と 1  $\mu$ g の Dn-EGFP (lox66 配列と EGFP 遺伝子) をリポフェクトアミンプラス試薬 (インビトロジェン) を用いて 25 トランスフェクションし、ピューロマイシンにより選択後、FISH により挿入した

EGFP が人工染色体上に存在することを確認した。

#### 15-4. 人工染色体からの EGFP の発現量の定量

ヒト  $\beta$  グロビン LCR を含まないアクセプター前駆体 (BAC-bsr-lox71ox) を使用  
5 した場合には Dn-EGFP を挿入することに成功していないので、pEGFP-C1 (Dn-EGFP  
の作製に用いた EGFP 遺伝子) を染色体上のランダムな場所に組み込んだ安定株  
(pEGFP を HT1080 に導入することによって得られる細胞株) と比較した。トリプ  
シン処理により個別にした各細胞の EGFP の蛍光強度を IPLab ソフト(日本ローパ  
ー)により定量した結果、人工染色体に挿入した EGFP の蛍光は染色体上数倍から  
10 十倍程度の EGFP 蛍光を発していることがわかった (図 19)。

本発明は、上記発明の実施の形態の説明に何ら限定されるものではなく、特許  
請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様  
もこの発明に含まれる。

15

本明細書における引用文献を以下に列挙する。

Ando, S., Yang, H., Nozaki, N., Okazaki, T. & Yoda, K. (2002) CENP-A,  
-B, and -C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite ar  
ray constitutes the prekinetochore in HeLa cells. Mol. Cell. Biol. 22, 2  
20 229-2241.

Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., et al. (2001) Selectiv  
e recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo dom  
ain. Nature 410, 120-124.

Ebersole, T.A., Ross, A., Clark, E., et al. (2000) Mammalian artificia  
25 l chromosome formation from circular alphoid input DNA does not require

telomere repeats. *Hum. Mo. Genet.* 9, 1623-1631

Dong, J.Y., Fan, P.D. & Frizzell, R.A. (1996) Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum. Gene Ther.* 7, 2101-2112.

5 Festenstein, R., Tolaini, M., Corbella, P., et al. (1996) Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. *Science* 271, 1123-1125.

Fisher, K.J., Jooss, K., Alston, J., Yang, Y., Haeker, S.E., High, K., Pathak, R., Raper, S.E. & Wilson, J.M. (1997) Recombinant adeno-associa  
10 ted virus for muscle directed gene therapy. *Nature Med.* 3, 306-312.

Fournier, R.E.K. & Ruddle, F.H. (1977) Microcell-mediated transfer of murine chromosomes into mouse, Chinese hamster, and human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 319-323.

15 Grimes, B.R., Schindelhauer, D., McGill, N.I., et al. (2001) Stable ge  
ne expression from a mammalian artificial chromosome. *EMBO Rep.* 2, 910-9  
14.

Henning, K.A., Novotny, E.A., Compton, S.T., et al. (1999) Human artif  
icial chromosomes generated by modification of a yeast artificial chromo  
some containing both human alpha satellite and single-copy DNA sequences.  
20 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 592-597.

Hibiya, M., Ichinose, H., Ozaki, N., et al. (2000) Normal values and a  
ge-dependent changes in GTP cyclohydrolase I activity in stimulated mono  
nuclear blood cells measured by high-performance liquid chromatography.  
*J. Chromatogr B. Biomed. Sci. Appl.* 740, 35-42.

25 Howman, E.V., Fowler, K.J., Newson, A.J., et al. (2000) Early disrupti

on of centromeric chromatin organization in centromere protein A (Cenpa) null mice. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97, 1148-1153.

Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., et al. (2002) The Ensembl genome database project. Nucl. Acids Res. 30, 38-41.

5 Ichinose, H., Ohye, T., Takahashi, E., et al. (1994) Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GTP cyclohydrolase I gene. Nature. Genet. 8, 236-242.

10 Ichinose, H., Ohye, T., Matsuda, Y., et al. (1995) Characterization of mouse and human GTP cyclohydrolase I genes. Mutations in patients with GTP cyclohydrolase I deficiency. J. Biol. Chem. 270, 10062-10071.

Ichinose, H., Suzuki, T., Inagaki, H., Ohye, T. & Nagatsu, T. (1999) Molecular genetics of dopa-responsive dystonia. Biol. Chem. 380, 1355-1364.

15 Ikeno, M., Masumoto, H. & Okazaki, T. (1994) Distribution of CENP-B boxes reflected in CREST centromere antigenic sites on long-range alpha-satellite DNA arrays of human chromosome 21. Hum. Mol. Genet. 3, 1245-1257.

Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., et al. (1998) Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. Nature Biotechnol. 16, 431-439.

20 Karpen, G.H. (1994) Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. Curr. Opin. Genet. Dev. 4, 281-291.

Karpen, G.H. & Allshire, R.C. (1997) The case for epigenetic effects on centromere identity and function. Trends Genet. 13, 489-496.

25 Kaufman, S. (1993) New tetrahydrobiopterin-dependent systems. Annu. Rev. Nutr. 13, 261-286.

- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. (2001) Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
- Mejia, J.E., Willmott, A., Levy, E., Earnshaw, W.C. & Larin, Z. (2001) Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 315-326.
- Milot, E., Strouboulis, J., Trimborn, T., et al. (1996) Heterochromatin effects on the frequency and duration of LCR-mediated gene transcription. *Cell* 87, 105-114.
- Mineta, T., Rabkin, S.D., Yazaki, T., Hunter, W.D., & Martuza, R.L. (1995) Attenuated multi-mutated herpes simplex virus-1 for the treatment of malignant gliomas. *Nature Med.* 1, 938-943.
- Muramatsu, S., Fujimoto, K., Ikeguchi, K., et al. (2002) Behavioral recovery in a primate model of Parkinson's disease by triple transduction of striatal cells with adeno-associated viral vectors expressing dopamine-synthesizing enzymes. *Hum. Gene Ther.* 13, 345-354.
- Nichol, C.A., Smith, G.K. & Duch, D.S. (1985) Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 729-764.
- Ota, A., Yoshida, S., Nomura, T., Matsui, S., Hagino, Y., Umezawa, K., Katoh, S. & Nagatsu, T. (1996) Tetrahydrobiopterin biosynthesis enhanced by lipopolysaccharide stimulation in murine neuroblastoma cell line N1E-115. *J. Neurochem.* 67, 2540-2548.
- Palmer, D.K., O'Day, K., Trong, H.L., Charbonneau, H. & Margolis, R.L. (1991) Purification of the centromere-specific protein CENP-A and demon-

stration that it is a distinctive histone. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 88, 3734-3738.

Pfeifer, A. & Verma, I.M. (2001) Gene therapy: promises and problems. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2, 177-211

5 Platero, J. S., Hartnett, T. & Eissenberg, J. C. (1995) Functional analysis of the chromo domain of HP1. EMBO J. 14, 3977-3986.

Shen, M.H., Yang, J., Loupart, M.L., Smith, A., Brown, W. (1997) Human mini-chromosomes in mouse embryonal stem cells. Hum. Mol. Genet. 6, 137 5-82.

10 Tanaka, K., Kaufman, S. & Milstein, S. (1989) Tetrahydrobiopterin, the cofactor for aromatic amino acid hydroxylases, is synthesized by and regulates proliferation of erythroid cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5864-5867.

15 Wade-Martins, R., White, R.E., Kimura, H., Cook, P.R. & James M.R. (2000) Stable correction of a genetic deficiency in human cells by an episome carrying a 115 kb genomic transgene. Nature Biotechnol. 18, 1311-1314.

20 Werner, E.R., Werner-Felmayer ,G., Fuchs ,D., et al. (1990) Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T 24 cells. GTP-cyclohydrolase I is stimulated by interferon-gamma, and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase are constitutively present. J. Biol. Chem. 265, 3189-3192.

Werner, E.R., Werner-Felmayer, G. & Wachter, H. (1993) Tetrahydrobiopterin and cytokines. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 203, 1-12.

25 Yen, T.J., Compton, D.A., Wise, D., et al. (1991) CENP-E, a novel huma

n centromere-associated protein required for progression from metaphase to anaphase. EMBO J. 10, 1245-1254.

Kimi Araki, Masatake Araki and Ken-ichi Yamamura. Target integration of DNA using munatn lox sites in embryonic stem cells. Nucleic Acids Research, 1997, vol.25, No4, 868-872

### 産業上の利用の可能性

本発明によれば、目的遺伝子に加えてその本来の制御領域をも含む巨大な DNA 領域を保持する哺乳類人工染色体が提供される。従って、哺乳類人工染色体に保持された遺伝子から本来の制御様式で遺伝子発現を行うことができる。

本発明の哺乳類人工染色体は、これを他の細胞に移入したり、或は胚性幹細胞などを経て個体レベルでの研究にも使用できる。従って、組織特異的遺伝子発現、経時的遺伝子発現の研究やモデル動物を使用したヒト型遺伝子の研究、薬剤（阻害剤、促進剤など）の開発などに極めて有用なツールとなる。

例えば、本発明の方法によって得られる、目的遺伝子を保持した人工染色体を保有する胚性幹細胞を利用すれば、目的遺伝子を発現するヒト人工染色体を保有した形質転換動物（キメラ動物を含む）を作出でき、単独遺伝子の発現様式を個体レベルで解析することが可能となる。また、本発明の HAC を保有するクローニング動物の作出も可能と考えられる。以上のようなヒト人工染色体を保有した形質転換動物は遺伝子治療のモデルとして利用され得る。更には、目的遺伝子に対する薬剤の効果を生理的条件下で解析することにも利用され得る。

本発明の哺乳類人工染色体は遺伝子治療用のベクターとしても有用である。このように、本発明の哺乳類人工染色体は、目的遺伝子に加えてその本来の制御領域をも含む巨大な DNA 領域を運搬するための単純かつ一般的な方法を提供するものである。

## 請求の範囲

1. 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、  
5 形質転換細胞を選択する第2工程と、及び  
選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する  
第3工程と、  
を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。
- 10 2. 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、  
を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、  
形質転換細胞を選択する第2工程と、及び  
選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する  
15 第3工程と、  
を含むことを特徴とする哺乳類人工染色体の作製方法。
- 20 3. 前記第1ベクターが選択マーカー遺伝子を有し、前記第2工程における形質転換細胞の選択は該選択マーカー遺伝子を利用して行われる、請求の範囲第1  
又項は第2項に記載の作製方法。
- 25 4. 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、請求の範囲第1項～第3項のいずれかに記載の作製方法、  
5'-NTTCGNNNNANNCGGGN-3'：配列番号1（但し、NはA, T, C, 及びGのいずれかで  
ある）。

5. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由來の配列を含む、請求の範囲第1項～第4項のいずれかに記載の作製方法。

5 6. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由來の11量体繰返しユニットを含む、請求の範囲第5項に記載の作製方法。

7. 前記哺乳類セントロメア配列のサイズは約50kb以下である、請求の範囲第1項～第6項のいずれかに記載の作製方法。

10 8. 前記機能配列が目的遺伝子及びその制御領域をコードする配列からなる、請求の範囲第1項～第7項のいずれかに記載の作製方法。

15 9. 前記目的遺伝子はハウスキーピング遺伝子以外の遺伝子である、請求の範囲第8項に記載の作製方法。

10. 前記目的遺伝子はヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼIの構造遺伝子である、請求の範囲第8項に記載の作製方法。

20 11. 前記機能配列はヒト $\beta$ グロビン遺伝子群全領域をコードする配列である、請求の範囲第8項に記載の作製方法。

12. 前記機能配列は、所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列からなる、請求の範囲第1項～第7項のいずれかに記載の作製方法。

13. 前記挿入用配列が loxP サイト若しくは FRT サイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、請求の範囲第 12 項に記載の作製方法。

5 14. 前記第 1 工程において導入する、前記第 1 ベクターと前記第 2 ベクターの量比はモル比で約 10 : 1 ~ 約 1 : 10 の範囲にある、請求の範囲第 1 項 ~ 第 13 項のいずれかに記載の作製方法。

10 15. 前記第 2 ベクターとして、それに含まれる機能配列が互いに異なる複数のベクターが使用される、請求の範囲第 1 項 ~ 第 14 項のいずれかに記載の作製方法。

16. 前記第 2 ベクターがインスレーター配列をさらに含む、請求の範囲第 1 項 ~ 第 15 項のいずれかに記載の作製方法。

15 17. 請求の範囲第 1 項 ~ 第 16 項のいずれかに記載の作製方法によって得られ、

哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列を有し、環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

18. 請求の範囲第 1 項 ~ 16 項のいずれかに記載の作製方法によって得られ、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに目的遺伝子及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

25 線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及

び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

19. 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、並びに目的遺伝子（ハウスキーピング遺伝子を除く）及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

5 環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

20. 前記目的遺伝子はヒトグアノシン三リン酸シクロヒドロラーゼⅠの構造遺伝子である、請求の範囲第19項に記載の哺乳類人工染色体。

10

21. 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、並びに目的遺伝子（ハウスキーピング遺伝子を除く）及びその制御領域をコードする機能配列を有し、

15 線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

22. 前記機能配列はヒト $\beta$ グロビン遺伝子群全領域からなる、請求の範囲第21項に記載の哺乳類人工染色体。

20 23. 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列を有し、

環状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

25 24. 哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、及び

所望の配列を特異的に挿入するための挿入用配列を有し、

線状であって、哺乳類細胞中で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、及び細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体。

5 25. 前記挿入用配列が loxP サイト若しくは FRT サイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列である、請求の範囲第 23 項又は第 24 項に記載の作製の哺乳類人工染色体。

26. 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列  
10 される領域を含む、請求の範囲第 17 項～第 25 項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体、

5' -NTTCGNNNNANNCGGGN-3' : 配列番号 1 (但し、N は A, T, C, 及び G のいずれかである)。

15 27. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由來の配列を含む、請求の範囲第 17 項～第 25 項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

28. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト 21 番染色体由來の 11 量体繰返しユニットを含む、請求の範囲第 27 項に記載の哺乳類人工染色体。

29. 前記機能配列又は前記挿入用配列を複数個有する、請求の範囲第 17 項～第 28 項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体。

25 30. インスレーター配列をさらに含む、請求の範囲第 17 項～第 29 項のい

いずれかに記載の哺乳類人工染色体。

31. 請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有する哺乳類細胞。

5

32. 請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有するヒト細胞。

33. 請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を自己の染色体外に保有する胚性幹細胞。

34. 請求の範囲第1項～第16項のいずれかに記載の作製方法によって得られる哺乳類人工染色体又は請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程を含む、  
15 ことを特徴とする、前記機能配列又は前記挿入用配列が長期間安定して維持可能な状態に導入された哺乳類細胞の作製方法。

35. 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、  
20 形質転換細胞を選択する第2工程と、  
選択された形質転換細胞の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、  
選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び  
分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入  
25 する第5工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

36. 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換細胞を選択する第2工程と、

選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞から前記哺乳類人工染色体を分離する第4工程と、及び

10 分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する第5工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

37. 哺乳類セントロメア配列を含む環状の第1ベクターと、機能配列を含む環状の第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換細胞を選択する第2工程と、

選択された形質転換細胞の中から、哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程と、

20 融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

38. 哺乳類セントロメア配列及び哺乳類テロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第1ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第2ベクターと、を哺乳類宿主細胞に導入する第1工程と、

形質転換細胞を選択する第2工程と、

5 選択された形質転換細胞の中から哺乳類人工染色体を保有する細胞を選択する第3工程と、

選択された細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞とを融合させる第4工程と、

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する第5工程と、及び

選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる第6工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

39. 請求の範囲第37項又は第38項に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、  
15 を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

40. 請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞から哺乳類人工染色体を分離する工程と、及び  
20 分離された前記哺乳類人工染色体をターゲット細胞としての哺乳類細胞に導入する工程と、

を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

41. 請求の範囲第17項～第30項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体を保有する宿主細胞と、微小核形成能を有する哺乳類細胞と、を融合させる工程と、  
25

融合細胞の中から、微小核形成能を有し、かつ前記哺乳類人工染色体を保有するハイブリッド細胞を選択する工程と、及び  
選択されたハイブリッド細胞から微小核を形成させる工程と、  
を含む、哺乳類人工染色体を含有する微小核体の作製方法。

5

4 2. 請求の範囲第 4 1 項に記載の作製方法によって得られる微小核体とターゲット細胞としての哺乳類細胞とを融合させる工程、  
を含む、哺乳類人工染色体を保有する哺乳類細胞の作製方法。

10 4 3. 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、  
又は組織幹細胞である、請求の範囲第 3 4 項、第 3 5 項、第 3 6 項、第 3 9 項、  
第 4 0 項、及び第 4 2 項のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

15 4 4. 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、  
又は組織幹細胞を、特定の組織の細胞へと分化するように誘導してなる細胞である、請求の範囲第 3 4 項、第 3 5 項、第 3 6 項、第 3 9 項、第 4 0 項、及び第 4 2 項のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

20 4 5. 前記ターゲット細胞としての哺乳類細胞は、哺乳類の受精卵である、請求の範囲第 3 4 項、第 3 5 項、第 3 6 項、第 3 9 項、第 4 0 項、及び第 4 2 項のいずれかに記載の哺乳類細胞の作製方法。

25 4 6. 哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターであって、  
サイズが約 50kb 以下の哺乳類セントロメア配列、及び選択マーカー遺伝子を含むベクター。

4 7. 前記哺乳類セントロメア配列は、以下の配列が規則的間隔で複数個配列される領域を含む、請求の範囲第4 6項に記載のベクター、

5' -NTTCGNNNNANNCGGGN-3'：配列番号1（但し、NはA,T,C,及びGのいずれかである）。

4 8. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト染色体アルファサテライト領域由來の配列を含む、請求の範囲第4 6項又は第4 7項に記載のベクター。

10 4 9. 前記哺乳類セントロメア配列はヒト21番染色体由来の11量体繰返しユニットを含む、請求の範囲第4 8項に記載のベクター。

5 0. 哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターであって、  
1oxPサイト若しくはFRTサイト又はこれらいずれかの配列の一部を改変した配  
列であって、前記所望の配列を挿入する機能を有する配列と、  
インスレーター配列と、を含むベクター。

5 1. 哺乳類人工染色体が導入されてなる、非ヒト形質転換動物。

20 5 2. 前記哺乳類人工染色体が、請求の範囲第1 7項～第1 9項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体である、請求の範囲第5 1項に記載の非ヒト形質転換動物。

5 3. 哺乳類人工染色体が導入されてなる、XO型マウス胚性幹細胞。

5 4 . 前記哺乳類人工染色体が、請求の範囲第 1 7 項～第 1 9 項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体である、請求の範囲第 5 3 項に記載の X0 型マウス胚性幹細胞。

5 5 5 . 哺乳類人工染色体が導入されてなる、メスキメラマウス。

5 6 . 前記哺乳類人工染色体が、請求の範囲第 1 7 項～第 1 9 項のいずれかに記載の哺乳類人工染色体である、請求の範囲第 5 5 項に記載の、メスキメラマウス。

Fig.1

導入BACs	検査されたBS'細胞株	アルフォイド及びBACシグナル			GCH1を保有するHAC
		HAC上	染色体上	検出されず	
CMV/ $\alpha$ 100 BAC +GCH1-BAC	16	1	4	11	1 (HT/GCH2-10)
SV/ $\alpha$ 50 BAC +GCH1-BAC	17	3	13	1	1 (HT/GCH5-18)

Fig.2

細胞株	GCH1活性 (pmol/h/mg タンパク質)		増加割合
	- IFN	+ IFN	
HT1080	0.05±0.02	0.76±0.03	15
HT/GCH2-10	0.16±0.02	5.0±0.2	31
HT/GCH5-18	3.4±0.2	16.5±0.6	4.8

Fig.3

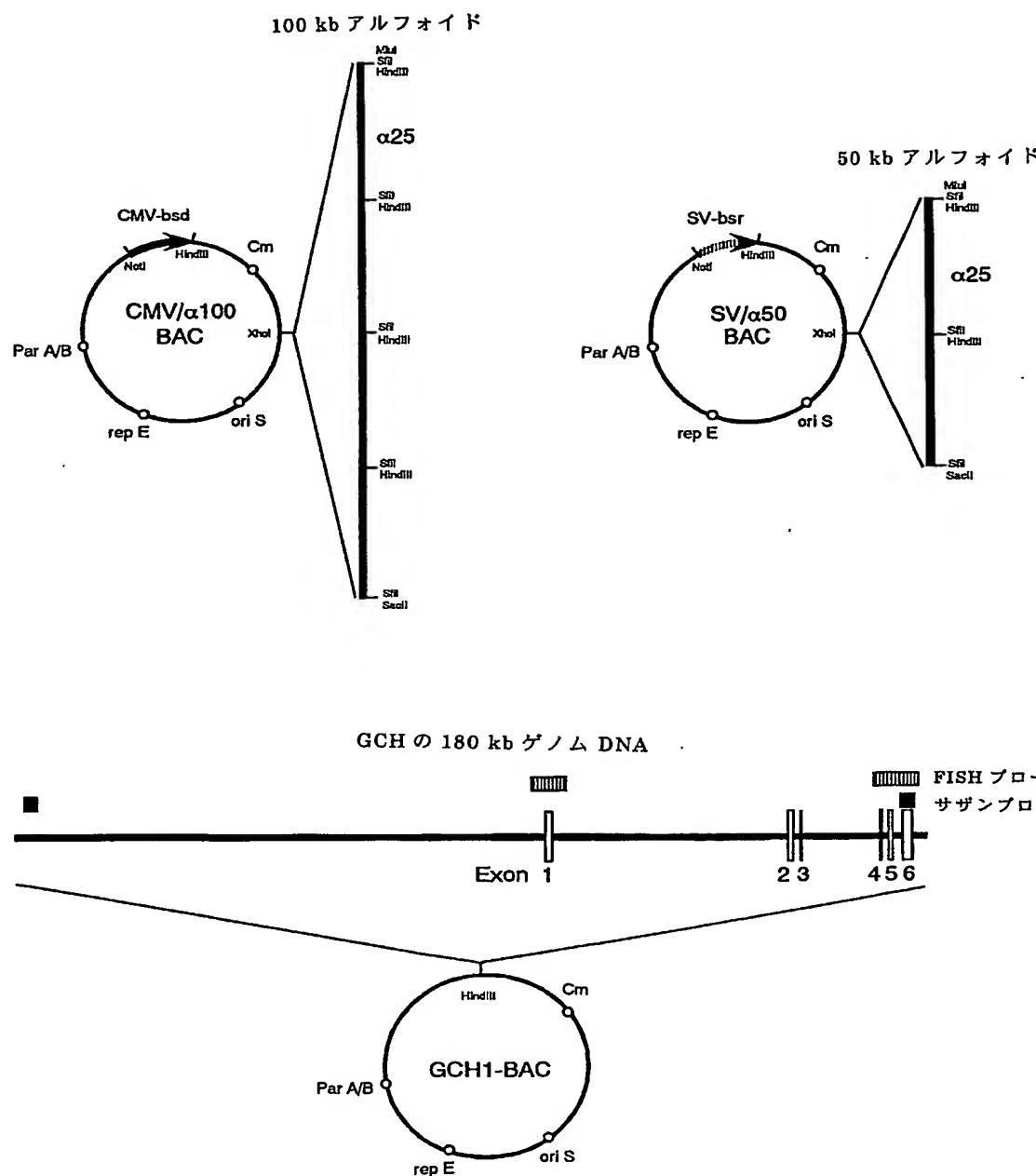
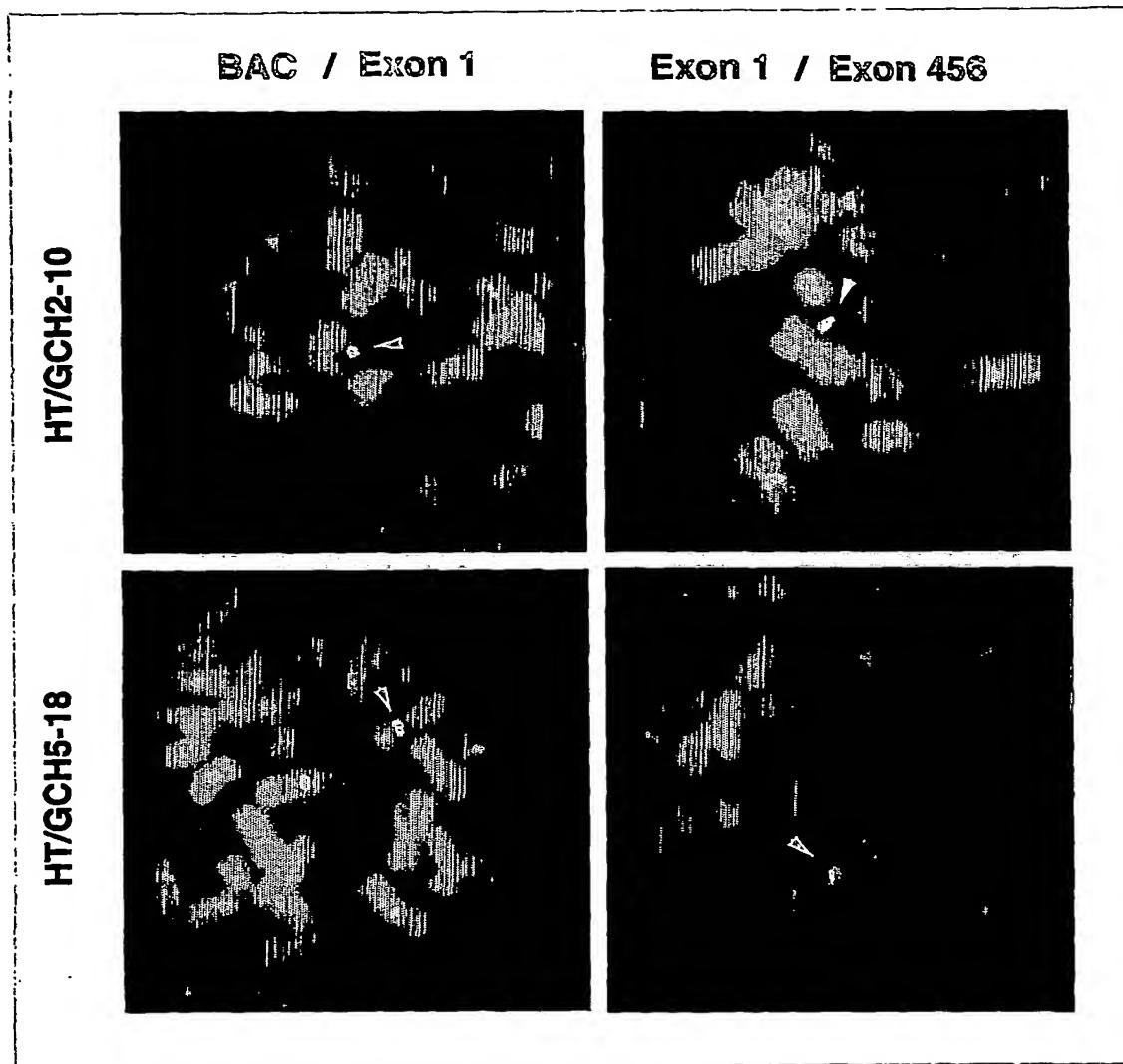


Fig.4



差換え用紙(規則26)

Fig.5

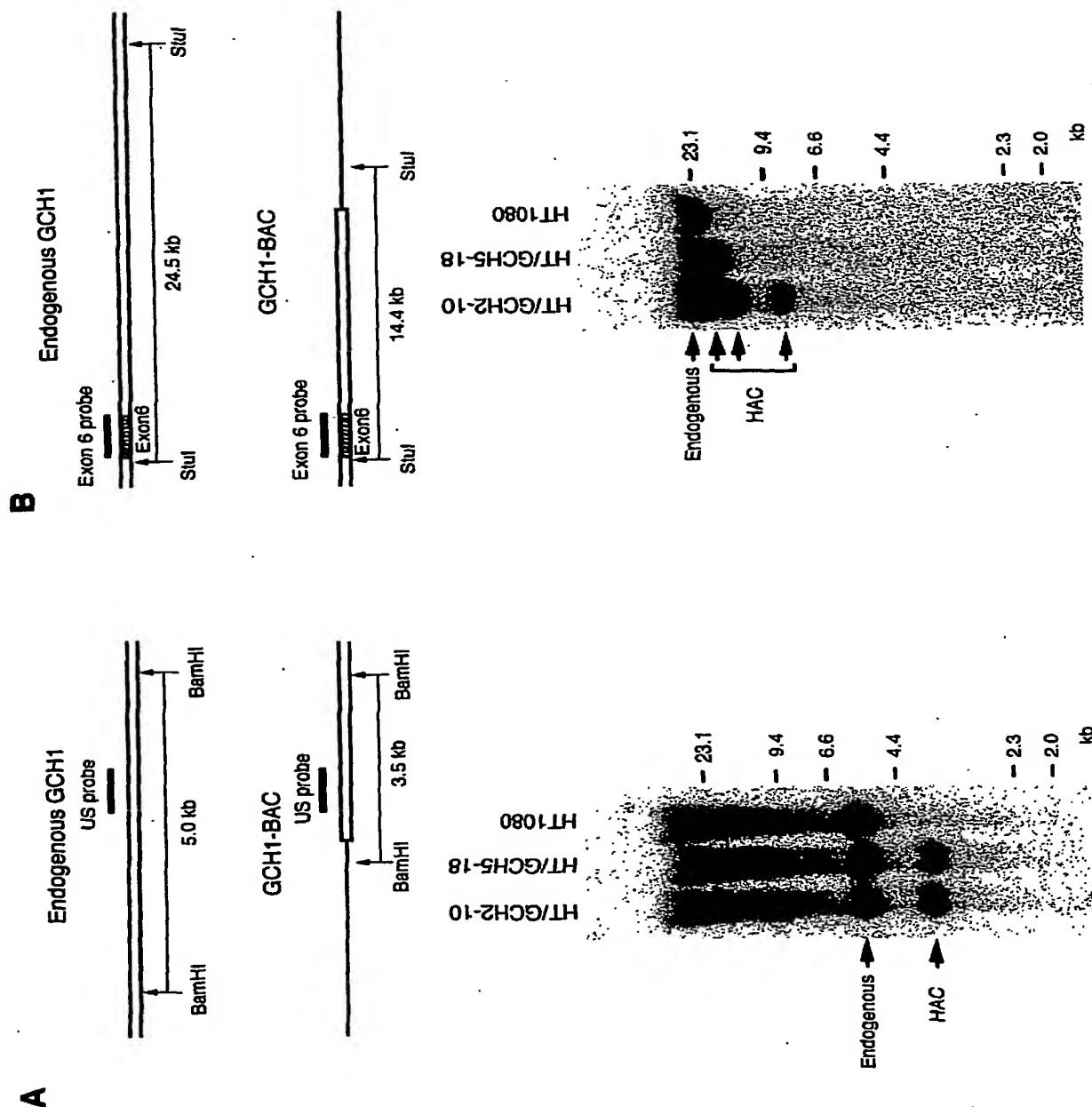


Fig.6

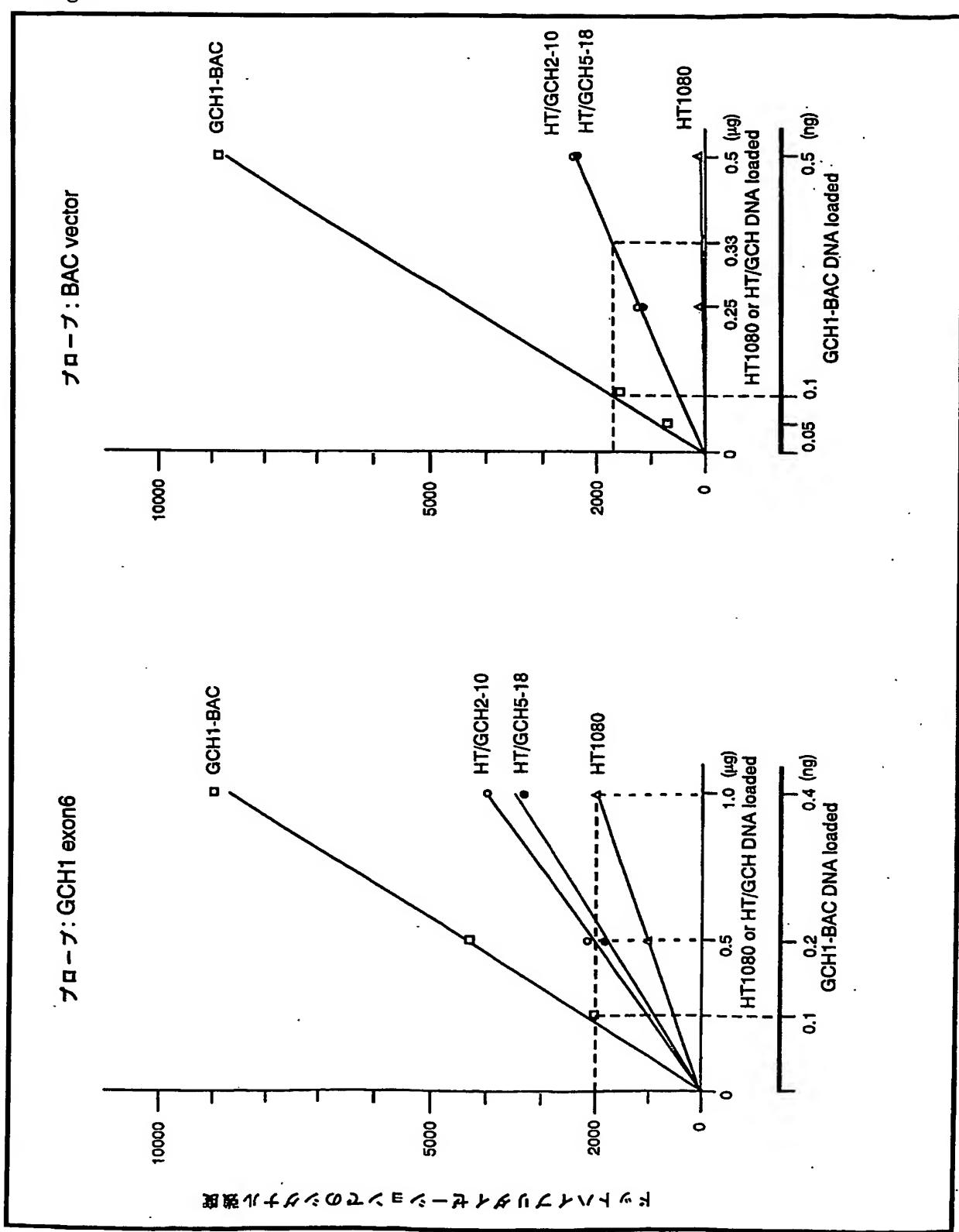
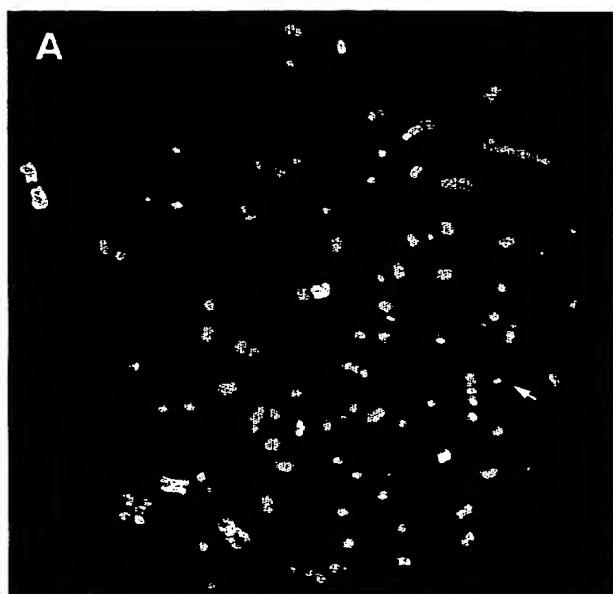
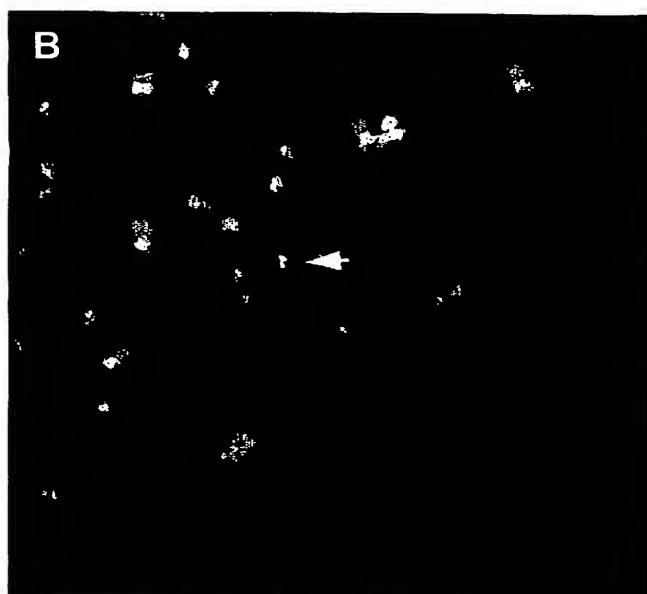


Fig.7

**Alu / BAC****BAC / Minor sat**

差換え用紙(規則26)

Fig.8

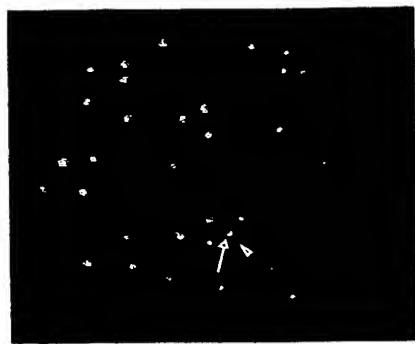
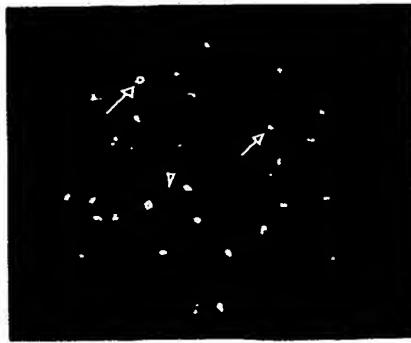
**A****alphoid/BAC****B****GCH1(exon 1)/BAC****C****minor satellite/BAC**

Fig.9

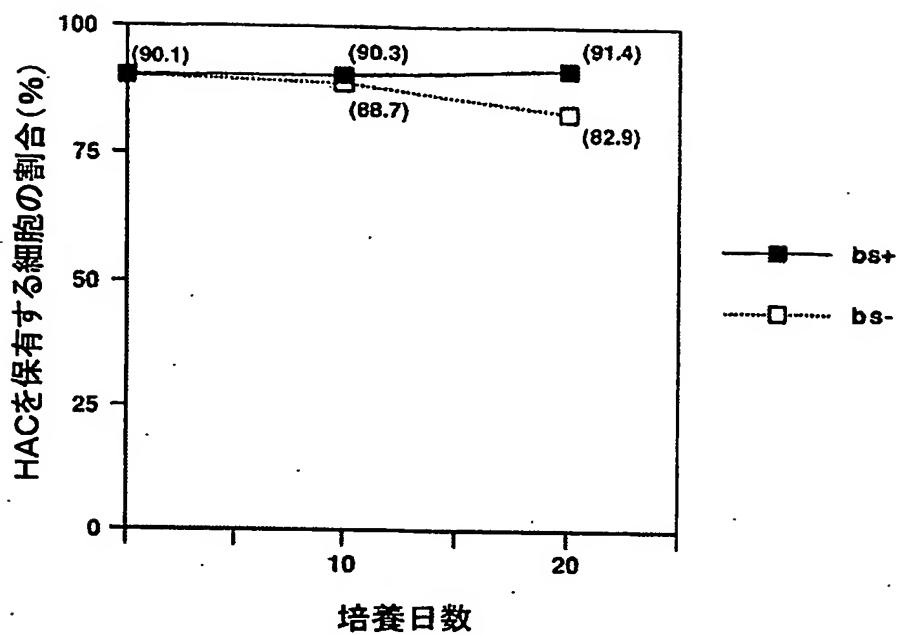


Fig.10

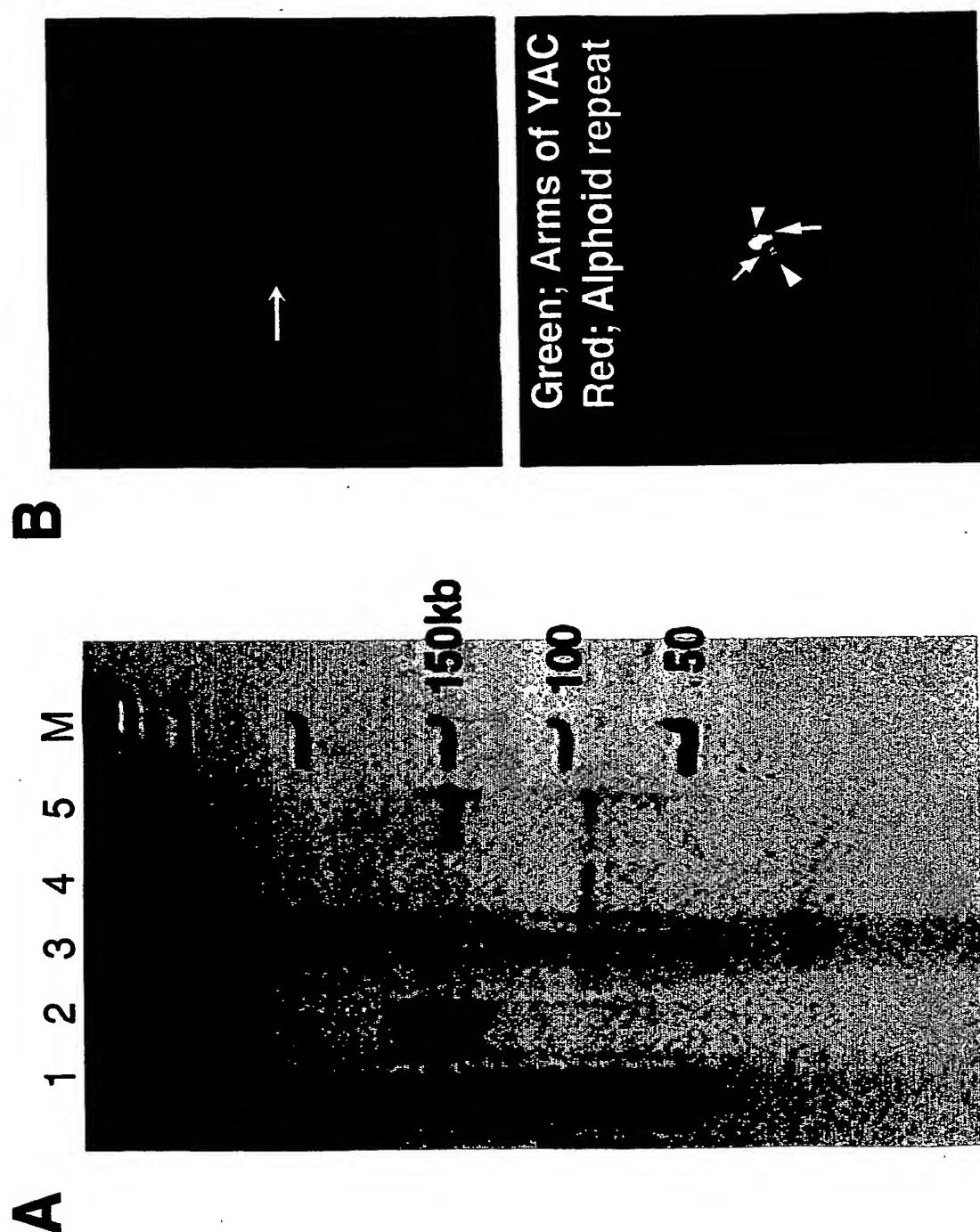


Fig.11

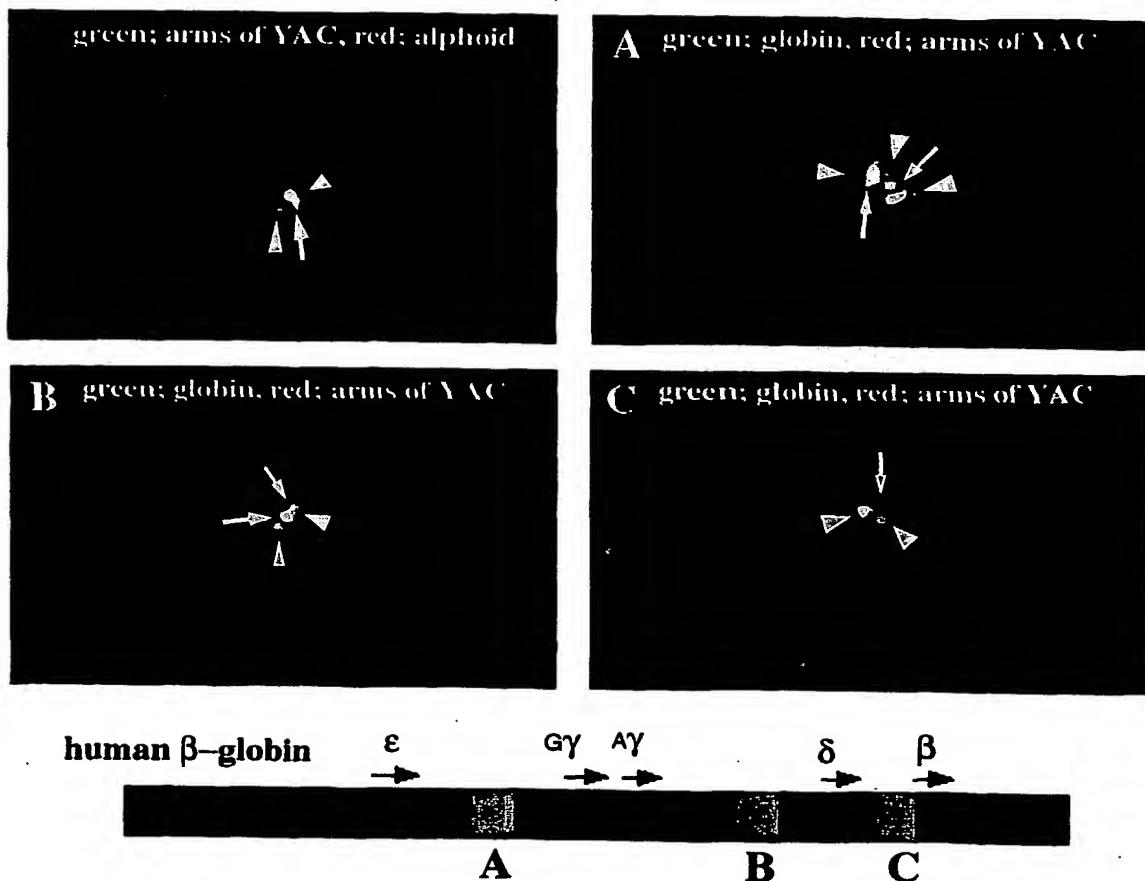
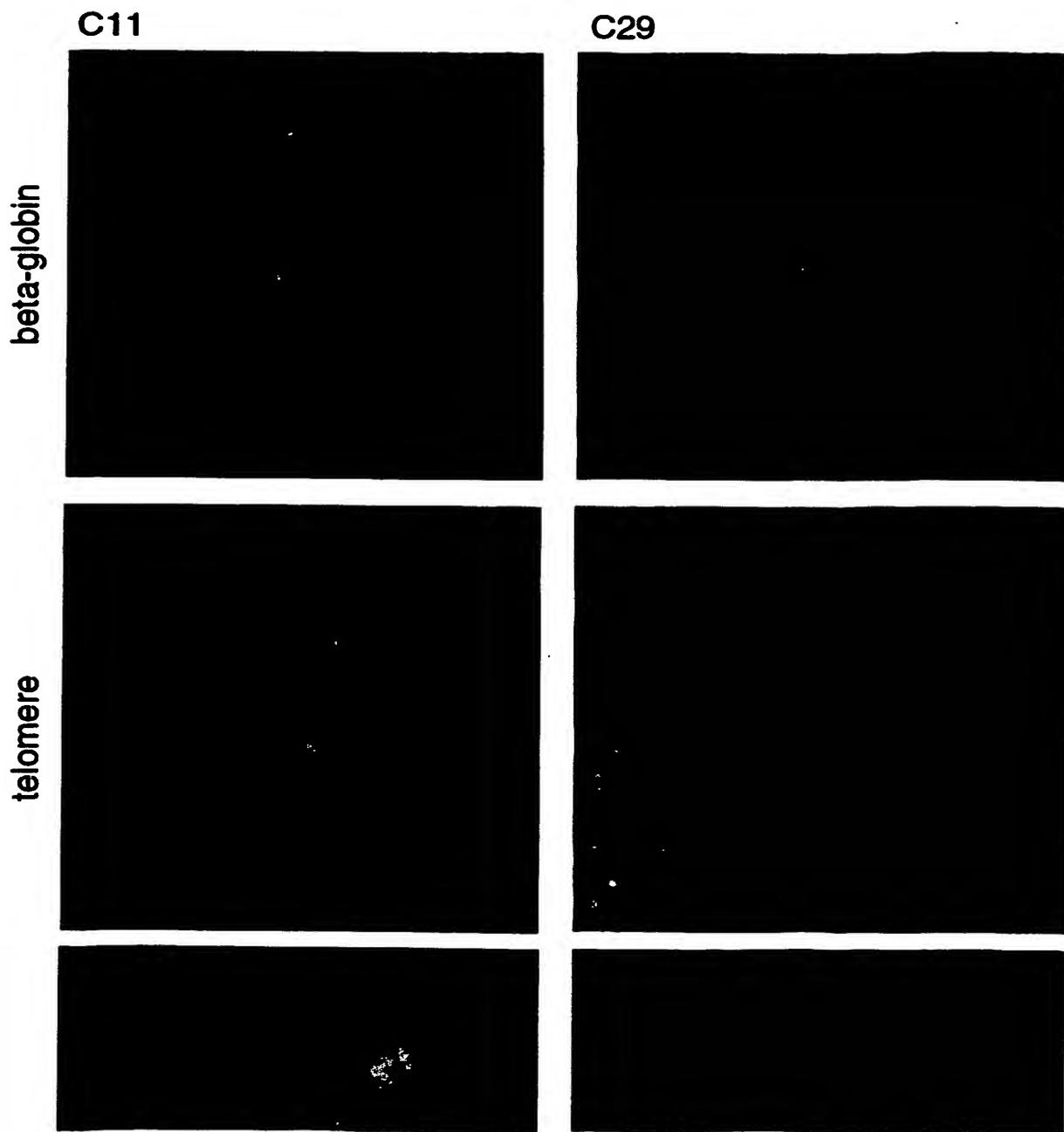


Fig.12



差換え用紙(規則26)

Fig.13



差換え用紙(規則26)

Fig.14

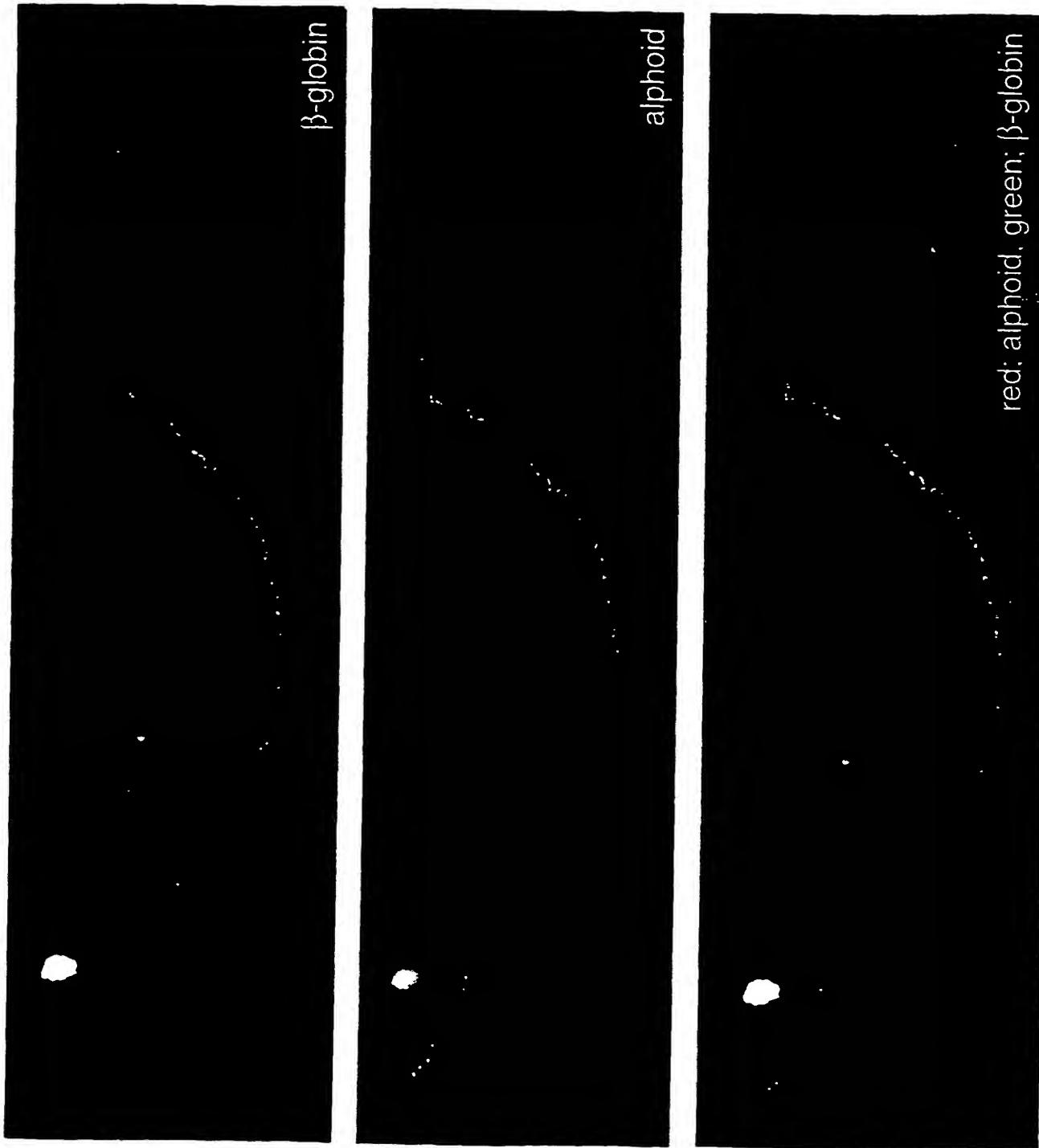
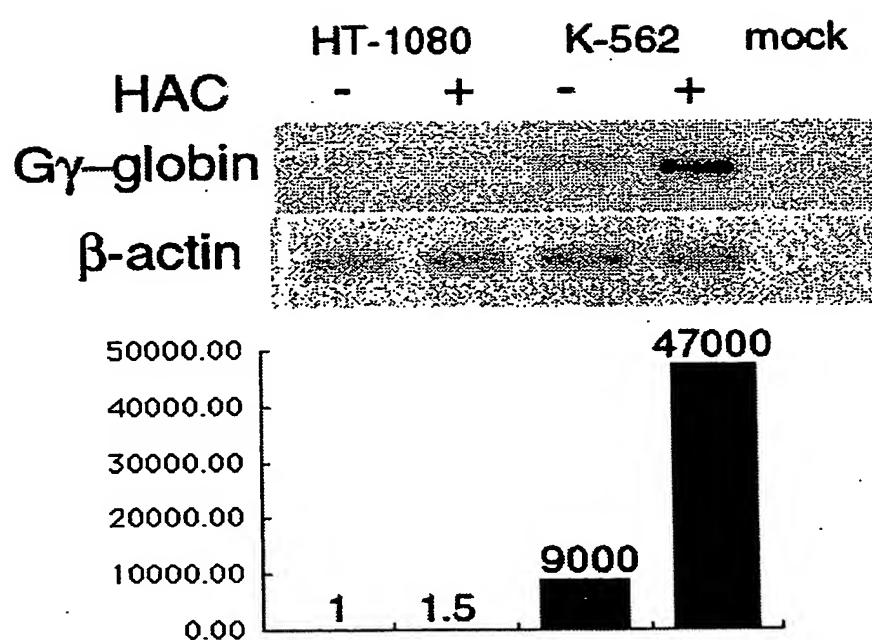


Fig.15



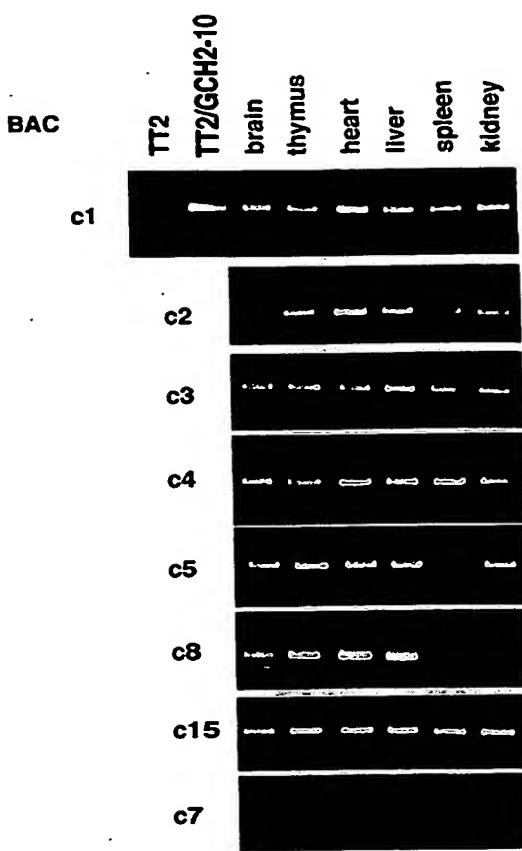
差換え用紙(規則26)

Fig.16

(a)



(b)



(c)

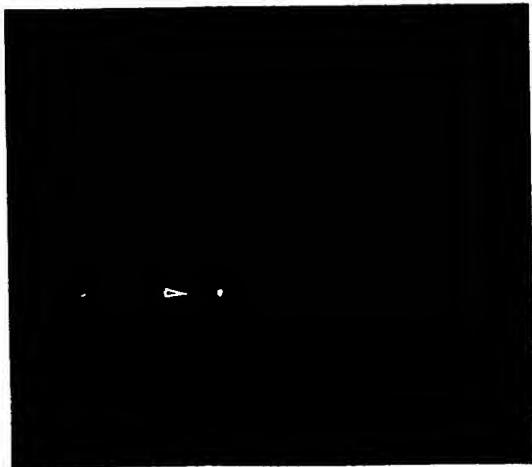
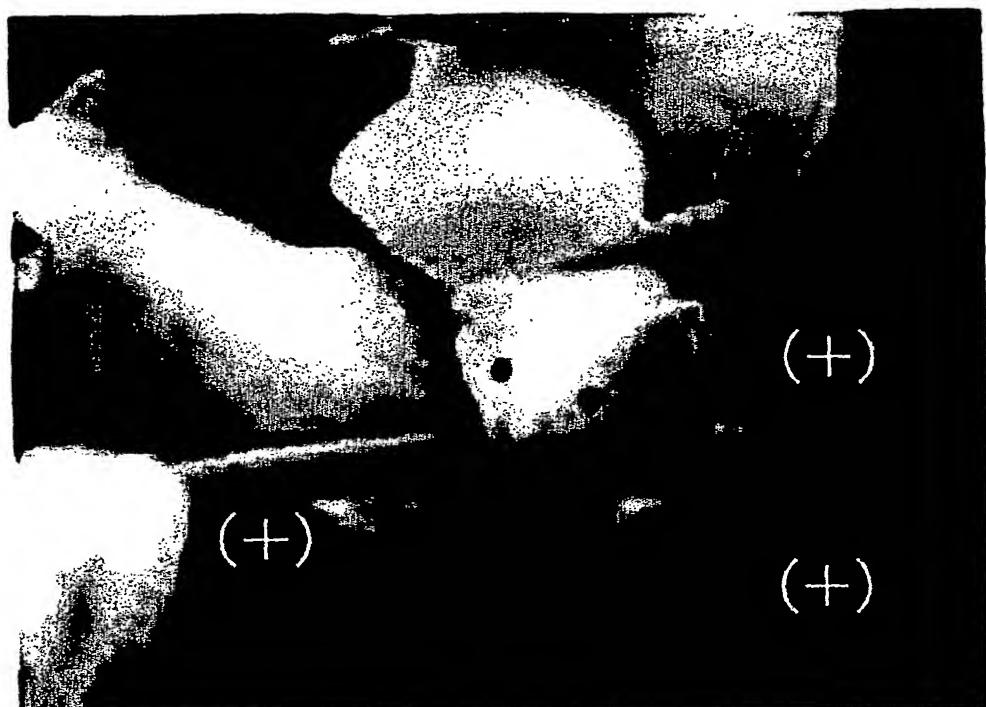


Fig.17



差換え用紙 (規則26)

Fig.18

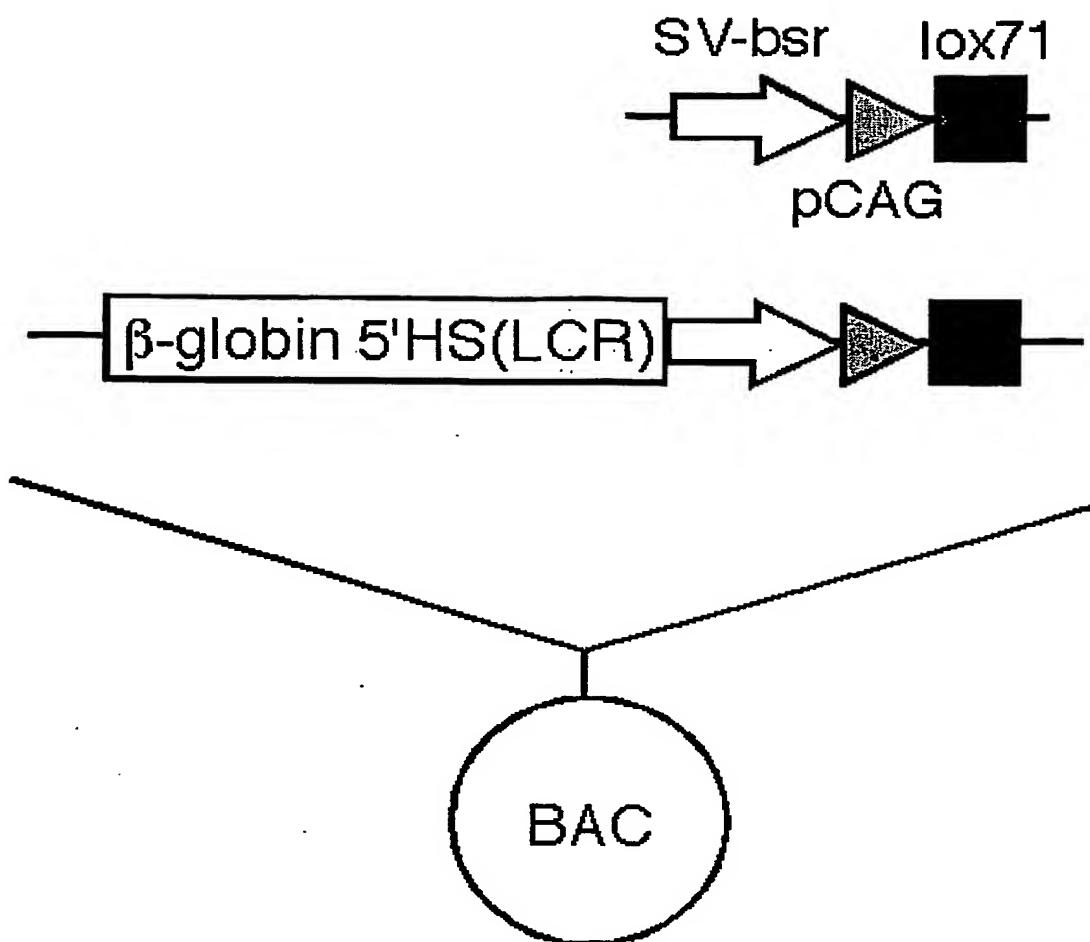
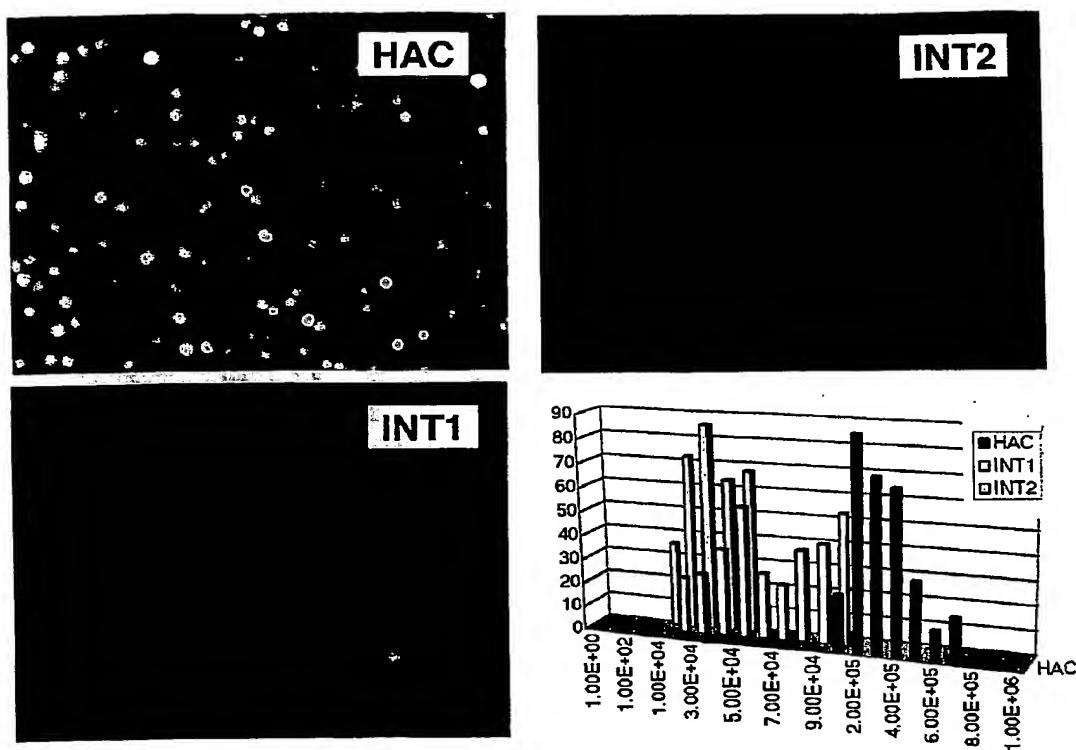


Fig.19



## SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

OKAZAKI, Tsuneko  
IKENO, Masashi  
ITOU, Toshihide  
SUZUKI, Nobukata

<120> Mammalian artificial chromosome

<130> P0203102

<150> JP P2002-258114

<151> 2002-09-03

<150> JP P2002-338865

<151> 2002-11-22

<160> 23

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> (1)..(17)

<223> Human chromosome centromere region

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> n stands for any base

<220>

<221> misc\_feature

<222> (6)..(9)

<223> n stands for any base

<220>

<221> misc\_feature

<222> (11)..(12)

<223> n stands for any base

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 1

nttcgnnnna nncgggn

17

<210> 2

<211> 17

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> (1)..(17)

<223> Human chromosome 21 centromere region

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> n stands for any base

<400> 2

nttcgttgaa aacggga

17

<210> 3

<211> 1868

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> source

<222> (1)..(1868)

<223> Human chromosome 21 centromere region

<400> 3

aattcaaata aaaggtagac agcagcattc tcagaaattt cttctgatg tctgcattca

60

actcatagag ttgaagattt ccttcata agcaggttt aaacacttt tctggatgtat 120  
ctggatgtgg acatttggag cgcttgcata cctacgggtgg aaaagtaaat atcttcata 180  
aaaacgagac agaaggatc tcagaaacaa gtttgtatg tgttactca gctaacagag 240  
tggaaccctt cttttacag agcagcttgg aaactctatt tttgtggatt ctgcaaattt 300  
atattttagat tgcttaacg atatcggtgg aaaagggat atcgtcatac aaaatctaga 360  
cagaagcatt ctcacaaact tctttgtat gtgtgcctc aactaacaga gttgaacctt 420  
tctttgtatc cagcagtttgg gaaacactt ttttgttactt actgttactt gatatttgg 480  
tagctctaac gatttcgttgg gaaacgggaa tatcatcatc taaaatctatc acagaagcac 540  
tattagaaac tacttgggtatc tatctgcatt caagtcacat agttgaacat tcccttactt 600  
tgagcacgtt tgaaacactc ttttggagaactt gtttggatgttgg agcgctttga 660  
ctgccttgcgtt tgaaaaggaa acgtttcca ataaaagcca gacagaagca ttctcagaaaa 720  
cttggcgttgcgtt atgtgtgtac tcaactaaaa gagttgaacc tttctatttga tagagcattt 780  
ttgaaacactt cttttggatgttgg attctgcaag tggatatttgg gattgctttgg aggatttgcgtt 840  
ttggaaacgttggg aattcgtata aaaactagac agcagcattt ccagaaattt ctggata 900  
tttccattca actcatagag atgaacatgg ctttcata agcagggtttt aaacactttt 960  
ttttagttt gtggaaatgtgg acatttcgtat cgccttgcgtt cctacgggtgg aaaagggaaat 1020  
atctcccat aaaaatagac agaagcattt tcagaaactt gttgggtata tgtgtctcaa 1080  
ctaacagagt tgaactttgc cattgtatcactt gggcgtttt gaaacactt ttttggaa 1140  
tctgcgttgcgtt gatatttggatgttgg gatttgcgttgg gaaacgggaa ttcttctt 1200  
aggtagacag cagcatttctc agaaattttt ttctgtatcactt tgcatcaac tcatagagg 1260  
gaacattccc ttcatagag cagggtttggaa acacttttc tggatgtatctt ggatgtggac 1320  
atttggagcg ctttgcgttgcgtt tatgggtggaaa aagtaaatat ctcccataaa aaacgagaca 1380  
gaaggattctt gggcgtttggaa acacttttc tggatgtatctt ggatgtggac 1440  
ttttgtatcactt gcagtttggaa aacactttt ttctgtatcactt tgcatcaac tcatagagg 1500

gctctaata gttcggttgg aacgggaata tcatcatcta aaatctagac agaaggccctc 1560  
tcagaaacta ctttgtata tctgcattca agtcacagag ttgaacattc gctttcttag 1620  
agcacgttgg aaacactctt tttgtatgtt ctggaaagtgg acatttggag cgctttgatg 1680  
cccttggta aaaaggaaat gtcttccat aaaaactaga cagaaggatt ctcagaaact 1740  
tgttttgtat gttgttaccc agccaaagga gttgaacatt tctattgata gagcagttt 1800  
gaaacactct ttttgtggaa aatgcaggtg gatatttggaa tagcttggag gatttcgtt 1860  
gaagcggg 1868

<210> 4  
<211> 8286  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Probe for an arm region of YAC

<400> 4  
ttctcatgtt tgacagctt a tcatcgataa gcttaatgc ggttttat cacagttaaa 60  
ttgctaacgc agtcaggcac cgtgtatgaa atctaacaat ggcgtcatcg tcattctcg 120  
caccgtcacc ctggatgctg taggcattttt cttggatgtt ccgttactgc cgggccttt 180  
gcgggatatac gtccattccg acagcatcgc cagtactat ggcgtgtgc tagcgtata 240  
tgcgttgcgtt caatttctat ggcacccgt tctggagca ctgtccgacc gctttggccg 300  
ccgcccagtc ctgctcgctt cgctacttgg agccactatc gactacgcga tcatggcgc 360  
cacacccgtc ctgtggatca attccctta gtataaattt cactctgaac catctggaa 420  
ggaccggtaa ttatitcaaa tctcttttc aattgtatat gtgttatgtt atgtatgtata 480  
ctctttcttc aacaattaaa tactctcggt agccaaatgg gtttaaggcg caagacttt 540  
atttatcact acggaattcc gtaatcttga gatcggcgatc tcatggccccc cgggagatt 600  
ttttgttttt tatgtttcc attcacttcc cagacttgca agttgaaata tttttcaa 660  
gggaattgtat cctctacgcc ggacgcattcg tggccggcat caccggcgcc acaggtgcgg 720

ttgctggcgc ctatatcgcc gacatcacccg atgggaaaga tcgggctcgc cacttcggc 780  
tcatgagcgc ttgtttcgcc gtgggtatgg tggcaggccc cgtggccggg ggactgttg 840  
gcgccatctc cttgcattgc caattcctt cggcggcggt gctcaacggc ctcaacctac 900  
tactgggctg cttcctaattt caggagtcgc ataagggaga gcgtcgaccg atgccttga 960  
gaggcattcaa cccagtcagg tcctccgggt gggcgcccc catgactatc gtgcggcac 1020  
ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg ctctgggtca 1080  
tttcggcga ggaccgctt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg ctgcggat 1140  
tcggaatctt gcacgcccctc gctcaaggct tcgtcactgg tccggccacc aaacgttgc 1200  
gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cggccgacgc gctggctac gtcttgctgg 1260  
cggtcgac gcgaggctgg atggcattcc ccattatgat tcttcgcgt tccggccgca 1320  
tcgggatgcc cgcggtgcag gccatgcgtt ccaggcaggt agatgacgac catcagggac 1380  
agcttcaagg atcgctcgcg gctttacca gcctaacttc gatcactggc cggctgatcg 1440  
tcacggcgat ttatgccccc tcggcgagca catggAACGG gttggcatgg attgttaggc 1500  
ccgcctata ccttgtctgc ctccccgcgt tgctcgccg tgcatggagc cggccaccc 1560  
cgacctgaat ggaagccggc ggcacctcgc taacggattc accactccaa gaattggagc 1620  
caatcaattt ttggggagaa ctgtgaatgc gcaaaccaac ccttggcaga acatatccat 1680  
cgctccgcc atctccagca gcccacgcg ggcacccccc ccccccctt caattcaattt 1740  
catcattttt ttttattct ttttttgcgt ttgggtttct ttggaaatttt ttgttgcgtt 1800  
taatctccga acagaaggaa gaacgaagga aggagcacag acttagatgg gtatataac 1860  
gcataatgtt ttttgcgtt ttttttgcgt ttgggtttct ttggaaatttt ttgttgcgtt 1920  
caaaaaacccg caggaaacga agataaatca tgctgaaagc tacatataag gaacgtgtt 1980  
ctactcatcc tagtccgtt gtcggccaaatc tattttatcatgcacgaa aagcaaacaa 2040  
acttgcgtgc ttcatggat gtcgtacca ccaaggaatt actggagttt gttgaagcat 2100  
taggtcccaa aatttgcgtt ctaaaaaacac atgtggatat cttgcactgtt tttccatgg 2160

agggcacagt taagccgcta aaggcattat ccgccaagta caattttta ctcttcgaag 2220  
acagaaaatt tgctgacatt ggtaatacag tcaaattgca gtactctgcg ggtgtataca 2280  
gaatagcaga atgggcagac attacgaatg cacacggtgt ggtgggccca ggtattgtta 2340  
gcggtttgaa gcaggcggca gaagaagtaa caaaggaacc tagaggcctt ttgatgttag 2400  
cagaattgtc atgcaagggc tccctatcta ctggagaata tactaagggt actgttgaca 2460  
ttgcgaagag cgacaaaagat tttgttatcg gctttattgc tcaaagagac atgggtggaa 2520  
gagatgaagg ttacgattgg ttgattatga caccggtgt gggtttagat gacaagggag 2580  
acgcattggg tcaacagtat agaaccgtgg atgatgtggt ctctacagga tctgacatta 2640  
ttattgtgg aagaggacta tttgcaaagg gaagggatgc taaggttagag ggtgaacgtt 2700  
acagaaaagc aggctggaa gcatatttga gaagatgcgg ccagcaaaac taaaaaactg 2760  
tattataagt aaatgcattgt atactaaact cacaaattag agttcaatt taattatatc 2820  
agtattact cggcgtaat gattttata atgacaaaaa aaaaaaaaaatt ggaaagaaaa 2880  
gggggggggg gcagcggttgg gtcctggcca cgggtgcgc tgatcgtgct cctgtcggt 2940  
aggaccggc taggctggcg gggttgcctt actggttagc agaatgaatc accgatacgc 3000  
gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgaaa acgtctgcga cctgagcaac aacatgaatg 3060  
gttccgggtt tccgtgttgc gtaaaagtctg gaaacgcgga agtcagcgcc ctgcaccatt 3120  
atgttccgga tctgcattcgc aggatgctgc tggctaccct gtggaacacc tacatctgt 3180  
ttaacgaagc gctggcatttgc accctgagtg attttctct ggtccgcgc catccataacc 3240  
gccagttgtt taccctcaca acgttccagt aaccggcat gttcatcatc agtaaccgt 3300  
atcgtagca tcctctctcg tttcatcggt atcattaccc ccatgaacag aaattcccc 3360  
ttacacggag gcatcaagtg accaaacagg aaaaaaccgc ccttaacatg gcccgcctta 3420  
tcagaagcca gacattaacg cttctggaga aactcaacga gctggacgcg gatgaacagg 3480  
cagacatctg tgaatcgctt cacgaccacg ctgatgagct ttaccgcagc caagcttac 3540  
cctcgagggc tgcctcgccgc gtttcggta tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct 3600

ccggagacg gtcacagctt gtctgttaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg 3660  
cgctcagecg ggtgttggcg ggtgtcccccc cgccatg acccagtac gtagcgatag 3720  
cgagggttat actggcttaa ctatgcggca tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat 3780  
atgcggtgtaaataaccgca cagatgcgtaa aggagaaaaat accgcatcag gcgctttcc 3840  
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgccggcggc ggtatcagct 3900  
cacitcaaagg cgtaataacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 3960  
tgagcaaaagg gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc 4020  
cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 4080  
aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgcct 4140  
cctgttccga ccctggcgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc ggaaagcgtg 4200  
gcgcgttctc atagctcacg ctgttaggtat ctcagttcg tgtaggtcgt tcgctccaag 4260  
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgcgc gcgccttatac cgtaactat 4320  
cgtttgagt ccaacccggta aagacacgac ttatgcac tggcagcagc cactggtaac 4380  
aggattagca gagcgaggta tgttagggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaacc 4440  
tacggctaca ctagaaggac agtattttggat atctgcgcctc tgctgaagcc agttaccc 4500  
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggttttt 4560  
tttgggttgc a cgcacgat tacgcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 4620  
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttaggat tttgggtcatg 4680  
agattatcaa aaaggatttt cacctagatc ctttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca 4740  
atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcctaat cagtggaggca 4800  
cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtag 4860  
ataactacga tacgggagggtt cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgtat accgcaac 4920  
ccacgtcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaaag ggccgagcgc 4980  
agaagtggtc ctgcaactttt atccgcctcc atccagtcta ttaattttggccggaaagct 5040

agagtaagta gttgccagt taatagttt cgcaacgttg ttgcattgc tgcaggcatc 5100  
gtgggtcac gctgtcggt tcattcagct ccggcccca acgatcaagg 5160  
cgagttacat gatccccat gttgtcaaa aaagcggtt a gtccttcgg tcctccgate 5220  
gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtt a tcactcatgg ttatggcagc actgcataat 5280  
tctttaactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtagt a ctaacccaag 5340  
tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgcttt gcccggcgtc aacacggat 5400  
aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgetcatca ttggaaaacg ttcttcgggg 5460  
cgaaaactct caaggatctt accgctgtt agatccagtt cgatgttaacc cactcgtgca 5520  
ccaaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcggtt ctgggtgagc aaaaacagga 5580  
aggcaaaatg ccgcaaaaaaaaa ggaaataagg gcgcacacgga aatgttgaat actcatactc 5640  
ttccttttc aatattattt aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 5700  
tttgaatgtt a ttagaaaaaa taaacaaata ggggtccgc gcacatttc cggaaaagt 5760  
ccacctgacg tctaagaaac cattattatc atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc 5820  
acgaggccct ttcgtttca agaattaatt cggcgaaaa aagaaaaagg a gggccaag 5880  
agggaggcgtt ttggtagt a ttagcacgt gagtatacg gattaagcac acaaaggcag 5940  
cttggagtt gtctgttatt aatttcacag gtagttctgg tccattgggt aaagtttgcg 6000  
gttgcagag cacagaggcc gcagaatgtt ctctagattc cgatgtgac ttgctggta 6060  
ttatatgtgt gccaaataga aagagaacaa ttgaccgggt tattgcaagg aaaattcaa 6120  
gtttgtaaa agcatataaa aatagttcag gcactccgaa atacttgggtt ggcgtttc 6180  
gtaatcaacc taaggaggat gtttggctc tggtaatga ttacggcatt gatatgtcc 6240  
aactgcatttgg agatgagtgc tggcaagaat accaagagtt cctcggtttc ccagtttta 6300  
aaagactcgat tttccaaaaa gactgcaaca tactactcag tgcagcttca cagaaacctc 6360  
attcgatttat tcccttgcattt gattcagaag caggtggac aggtgaactt ttggattgga 6420  
actcgatttc tgactgggtt ggaaggcaag agagccccga aagcttacat tttatgttag 6480

ctgggtggact gacgccagaa aatgttggtg atgcgcttag attaaatggc gttattggtg 6540  
ttgatgtaaag cgagggtgtg gagacaaatg gtgtaaaaga ctctaacaatg atagcaaatt 6600  
tcgtcaaaaa tgctaagaaa taggttatta ctgagtagta tttatthaag tattgtttgt 6660  
gcacttgcct gcaggccccc taaaaagcaa gcataaaaga tctaaacata aaatctgtaa 6720  
aataacaaga tgtaaagata atgctaaatc atttggctt ttgattgatt gtacaggaaa 6780  
atatacatcg cagggggttt acttttacca ttccaccgca atggaatcaa acttgttcaa 6840  
gagaatgttc acaggcgcat acgctacaat gacccgattc ttgctagcct ttctcggtc 6900  
ttgcaaacaa ccgcggcag cttagtatataaatacacat gtacataacct ctctccgtat 6960  
cctcgtaatc attttcttgt atttatcgctc ttccgtgtt aaaaacttta tcacacttt 7020  
ctcaaataca cttatataacc gctttacta ttatcttcta cgctgacagt aatatcaaac 7080  
agtgacacat attaaacaca gtggtttctt tgcataaaca ccatcagcct caagtcgtca 7140  
agtaaagatt tcgtgttcat gcagatagat aacaatctat atgttgataa tttagcggttc 7200  
ctcatcaatg cgagatccgt ttaaccggac cctagtgac ttacccacg ttccgtccac 7260  
tgtgtgccga acatgtctt tcactattt aacatgtgga attaattcta aatcctttt 7320  
atatgatctg ccgatagata gttctaaatgc attgagggttc atcaacaatt ggattttctg 7380  
tttactcgac ttccggtaaa tgaaatgaga tgatactgc ttatctcata gttaactcta 7440  
agaggtgata cttatattact gtaaaactgt gacgataaaaa ccggaaaggaa gaataagaaa 7500  
actcgaaactg atctataatg cctatattctt gtaaagagtt taagctatga aagcctcggtc 7560  
attttggccg ctccctaggta gtgtttttt tccaaggaca aaacagtttc ttccgttgc 7620  
gcaggttta tgtttcggta atcataaaca ataaataat tatttcattt atgtttaaaa 7680  
ataaaaaaata aaaaagtatt ttaaattttt aaaaagttg attataagca tgtgaccctt 7740  
tgcaagcaat taaatttgc aatttgcattt tttaggcaaa agttacaatt tctggctcggtc 7800  
gttaatataatg tatgctaaag tgaactttt caaagtcgtat atggacttag tcaaaaagaaa 7860  
ttttcttaaaa aatataatgc actagccaat ttagcacttc ttatgagat atattataga 7920

ctttattaag ccagatttgt gtattatatg tatttacccg gcgaatcatg gacatacatt 7980  
ctgaaatagg taatattctc tatggtgaga cagcatagat aacctaggat acaagttaaa 8040  
agcttagtact gtttgcagt aattttttc tttttataa gaatgttacc acctaaataa 8100  
gttataaagt caatagttaa gtttgatatt tgattgtaaa ataccgtaat atatttgcatt 8160  
gatcaaaaagg ctcaatgttg actagccagc atgtcaacca ctatattgat caccgatata 8220  
tggacttcca caccaactag taatatgaca ataaattcaa gatattttc atgagaatgg 8280  
cccaga 8286

<210> 5  
<211> 3631  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 5  
aagaccagat agtacagggc ctggctacaa aaataacaagc ttttactatg ctattgcaat 60  
actaaacgat aagcattagg atgttaagtg actcaggaaa taagatttg ggaaaaagta 120  
atctgcttat gtgcacaaaaa tggattcaag tttgcagata aaataaaaata tggatgatga 180  
ttcaagggga cagatacaat ggttcaaacc caagaggagc agtgagtctg tggaaattttg 240  
aaggatggac aaaggtgggg tgagaaagac atagtattcg acctgactgt gggagatgag 300  
aaggaagaag gaggtgataa atgactgaaa gctccagac tggtaagat aacaggagga 360  
aaccatgcac ttgaccctgg tgactctcat gtgtgaaggg tagagggata ttaacagatt 420  
tacttttag gaagtgc tag attggtcagg gagtttgac cttcagggtct tgtgtcttc 480  
atatcaagga acctttgcattttccaaagtt agagtgc cat atttggcaa atataacttt 540  
attagtaatt ttatagtgct ctcacattga tcagactttt tcctgtgaat tactttgaa 600  
tttggctgta tataccaga atatggaga gagacaataa attattgttag ttgcaggcta 660  
tcaacaatac tggctctct gaggcattata accttcaat atgccccata aacagagtaa 720  
acagggatta ttcatggcac taaatattt cacctaggc agtcaacaaa tggaggcaat 780  
gtgcatttt tgatacatat ttttatatat ttatgggca tgtgatactt acatgcctag 840



ggtttcatat tctgttccat tggtccgatg tgccatttg tacaccagca tcatgctgtg 2340  
ttttggtga ctatggcctt attgtatagt ttgaaatgag gtaatgtaat gccattcaga 2400  
tttgttcttt ttttagact tgctgttta ttgggcctt tttgggtcc ataagaattt 2460  
taggattgtt tttctagtt ctgtgaaggc taatgggtt atttatgggaa attgcaatgc 2520  
aattttaggg ttgcctctgg cattatggcc atttcacaa tattgattct acccatctat 2580  
gagaatggca tgcgtttcca ttgtttgtg tcttatatga ttactatcag ccgtgtttt 2640  
tagtttcct tgcgtatgtc ttccacctcc ttgggttaggt atatattcct aagttttgt 2700  
tttgttttgtt ttgtttttt gcagctattt gaaaaagggt tgagtttattt attttattct 2760  
catctggtc attgctggta tgtaagaaag caactcattt gtgtacgtt attttgtatc 2820  
cagaaaactt gctgaattttt ttatcagtt cttaggggtt ttggaggagt cttagagtt 2880  
ttctacatac acaatcatat catcagcaaa cagtgacagt ttgactttct cttaacaat 2940  
ttggatgtgc ttactttgtt tctctgtct gattgcctt gctaggactt ccagtaatatt 3000  
gtttaagaga agtggtgaga gtgggtatcc ttgttcattt ccagtttca gacagaatgc 3060  
tttaactttt ttccattca atataatgtt ggctgtgtt ttaccatagc tggcttttat 3120  
tacattgagg tatgtccctt gtaaaccgat ttgtgttagt tttagtcata aagtgtatgtt 3180  
gaattttgtt gaatgcagtt tctgtggcta ttgagataat cacatgattt ttgtttccaa 3240  
ttctctttat ttgtgtatc acacttattt gttttttttt gttttttttt ccgtgcattcc 3300  
ctcgcatgaa accacttgcat catgggtttt gatatgccgt gtggatgctt attagctata 3360  
tttgcataag gatgttggca tctatgttca tcagggatattt tgatctgttagt tggtttttttt 3420  
ttttggttat ttgttttttttcc agttttggta ttaaggtat actggcttca tagaaatgatt 3480  
tagggaggat tctcttttc tctatctgtt agaataactgtt caataggattt ggtatcaattt 3540  
cttctttttaa ttgtgttagt aattcgaacg tctccttttagt gttttctatgtt ttattcatgtt 3600  
aaagggttttca atagtaacccat tgaataatctt 3631

<210> 6  
<211> 3386  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
tgctaatgt tcattacaaa cttatatcct ttaattccag atggggcaa agtatgtcca 60  
ggggtgagga acaattgaaa catttggct ggagtagatt ttgaaagtca gctctgtgt 120  
tgtgtgtgt tggtgtgt tcagcgtgt tttctttaa cgtcttcagc ctacaacata 180  
cagggttcat ggtggagaaga agatagcaag atttaaatta tggccagtga ctatgtttg 240  
aagggaaca actacctgca ttaatggga aggcaaaatc tcaggcttg agggaagtt 300  
acataggctt gattctgggt ggaagctggg tgttagtt tctggaggcc aggtggagc 360  
tctcagctca ctatgggttc atcttatttgc ttccttca tctcaacagc tcctggaaa 420  
tgtgctggtg accgtttgg caatccattt cggcaaaagaa ttcacccctg aggtgcaggc 480  
ttcctggcag aagatggta ctgcagtggc cagtgcctg tcctccagat accactgagc 540  
ctctgccca tgattcagag ctttcaagga taggctttat tctgcaagca atacaataaa 600  
taaatctatt ctgctgagag atcacacatg atttctca gctttttt ttaacatctt 660  
ttaaatatat gagccacaaa gggtttatat tgagggagt gtgtatgtt atttctgcat 720  
gcctgtttgt gtttgtggtg tgtgcattgt cctcatttat ttttatatga gatgtgcatt 780  
ttgatgagca aataaaagca gtaaagacac ttgtacacgg gagttctgca agtggagta 840  
aatgggtttg gagaatccg gtggaaagaa agaccttat aggacaggac ttctcagaaa 900  
cagatgtttt ggaagagatg ggaaaagggtt cagtgaagac ctggggctg gattgattgc 960  
agctgagtag caaggatggt tcttaatgaa gggaaagtgt tccaagctt aggaattcaa 1020  
ggtttagtca ggtgtageaa ttctattta ttaggaggaa tactatttct aatggcactt 1080  
agctttcac agcccttgc gatgcctaag aaagtgaaat taatccatg ccctcaagt 1140  
tgcagattgg tcacagcatt tcaagggaga gacccatttgc taagactctg ggggaggtgg 1200  
ggacttaggt gtaagaaatg aatcagcaga ggctcacaag tcagcatgag catgttatgt 1260

ctgagaaaaca gaccagcact gtgagatcaa aatgttagtgg gaagaatttg tacaacatta 1320  
attggaaggt ttacttaatg gaattttgt atagttggat gtttgtcat ctctataagt 1380  
aagagttaa tatgtatggtg ttacggacct ggtgttgg ttcctcaaa attcacatgc 1440  
tgaatcccc actcccaact gaccttatct gtggggagg ctttgaaaa gtaatttagt 1500  
ttagctgac tcataagagc agatecccat cataaaatta tttcctt cagaaggcaga 1560  
gagacaagcc atttctctt cttccggtg aggacacagt gagaagtccg ccatctgcaa 1620  
tccaggaaga gaaccctgac cacgagtcag cttcgaaaa tgtgagaaaa aactctgtt 1680  
ttgaagccac ccagtctttt gtattttgtt atagcacctt acactgagta aggagatga 1740  
agaaggagaa aaaaataaagc ttgggtttt agtgaactac agaccatgtt atctcaggtt 1800  
tgcaaagtc ccctcgccc ctatgtttca gcataaaata cctactctac tactctcatc 1860  
tataagaccc aaataataag cctgcgcct tctctctaac tttgatttct cttttttta 1920  
cttcaacatg ctttactcta gccttgtaat gtcttacat acagtgaaat gtaaagttct 1980  
ttattctttt tttttttctt tctttttctt ctcagcetc agaatttggc acatgccctt 2040  
ccttcttca ggaacttctc caacatctc gcctggctcc atcatacat aaaggtccca 2100  
cttcaaatgc agtcaactacc gtttcaggat atgcacttcc tttttttt gttttttgtt 2160  
tttttaagt caaagcaaat ttcttgagag agtaaagaaaa taaacgaatg actactgcat 2220  
aggcagagca gccccgaggg ccgctgggtt ttcctttat gtttatttct tgatgatatg 2280  
ttaaacaagt ttggattat ttatgccttc tctttttagg ccatataggg taactttctg 2340  
acattgccat ggcattttc ttttaattta atttactgtt acctaaattt caggggtaca 2400  
cgtacaggat atgcagggtt gttttatagg taaaagtgtt ccatggttt aatgggtttt 2460  
ttttttcttg taaaagtgtt taagtttctt gtttactctg gatattggcc tttgtcagaa 2520  
gaatagattt gaaaatcttt ttcccattct gtagattgtc tttcgctctg atggtagttt 2580  
ctttgtga gcaggagctc ttttagttaa ttagattcca ttggcaattt ttgtttttt 2640  
ctgcaattgc tttcacgct ttcatacatga aatctgtgcc cgtgttata tcatgaatag 2700

tattgccttg attttttctt aggctttta tagtttgggg tttttcattt aagtctctaa 2760  
tccatccgga gttaattttg gataaggtat aaggaaggag tccagttca ttttcagca 2820  
tatggcttagc cagttctccc ccatcattta ttaaattgaa aatccttcc ccattgcttg 2880  
cttttgtcag gtttctaaaa gacagatggt ttaggtaca atatgcagtt ttcaagtc 2940  
atataatacc atctgaaatc tcttatttaat tcatttttt tagtatgtat gctggctcc 3000  
tctgtcaact atagtgaggg caccattagc cagagaatct gtctgtctag ttcatgtaa 3060  
attctcagaa ttaagaaaaaa tggatggcat atgaatgaaa cttcatggat gacatatgga 3120  
atctaattgt tatttgtga attaatgcat aagatcaac aagggaaagg ttgacaactg 3180  
cagtgataac ctggatttga tgatataaga gtctatagat cacagtagaa gcaataatca 3240  
tggaaaacaa ttggaaatgg ggaacagcca caaacaagaa agaatcaata ctaccaggaa 3300  
agtgactgca ggtcaactttt cctggagcgg gtgagagaaa agtggaaagtt gcagtaactg 3360  
cgaaattcct ggttggctga tggaaa 3386

<210> 7  
<211> 2838  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
gttaagaag gttcctgagg ctctacagat agggagcact tgtttatttt acaaagagta 60  
catggaaaaa gagaaaaagca agggAACGt acaaggcatt aatgggtgac acttctacct 120  
ccaaagagca gaaattatca agaactttg atacaagat aatactggca ctgcagaggt 180  
tctagggaaag acctcaaccc taagacatag cctcaagggt aatagctacg attaaactcc 240  
aacaattact gagaaaataa tgtgctcaat taaaggcata atgattactc aagacaatgt 300  
tatgttgct ttcttcctcc ttctttgcc tgcacattgt agcccataat actataaccc 360  
atcaagtgtt cctgctccaa gaaatagttt ctccttta ctggccccag aacatctctg 420  
taaagaattt cctttatct tcccatattt cagtcaagat tcattgctca cgtattactt 480  
gtgacctctc ttgaccccaag ccacaataaa cttctctata ctacccaaaa aatcttcca 540

aaccctcccc gacaccatat ttttatattt ttcttattta ttcatgcac acacacacac 600  
tccgtgctt ataagcaatt ctgcctattc tctacettct tacaatgcct actgtgcctc 660  
atattaaatt catcaatggg cagaaagaaa atatttattc aagaaaacag tgaatgaatg 720  
aacgaatgag taaatgagta aatgaaggaa tgattattcc ttgctttaga acttctggaa 780  
ttagaggaca atattaataa taccatcgca cagtgttct ttgttgtaa tgctacaaca 840  
tacaaagagg aagcatgcag taaacaacg aacagttatt tccttctga tcataggagt 900  
aatattttt tccttgagca cattttgcc ataggtaaaa tttaggat ttttagaact 960  
ttctcagttg tatacatttt taaaaatctg tattatatgc atgttgatta attttaact 1020  
tacttgaata cctaaacaga atctgttgtt tccttggtt taaaagtgtt ttcacagtaa 1080  
ctctgtctgt actgccagaa tatactgaca atgtgttata gttaactgtt ttgatcacaa 1140  
cattttgaat tgactggcag cagaagctt ttttatatcc atgtgtttc ctaagtcat 1200  
tatacatagt aggcatgaga ctcttatac tgaataagat atttaggaac cactggttt 1260  
catatcagaa gcagagctac tcagggcatt ttgggaaaga tcacttcac attcctgagc 1320  
atagggaaagt tctcataaga gtaagatatt aaaaggagat acttgtgtgg tattcgaaag 1380  
acagtaagag agattttaga cctttagatc ttgataggga aaacaaacta cattcatttc 1440  
tccaaaagtc aaaaaaaaaaag agcaaataa gcttactata ctttcttattc ctacaccatt 1500  
agaagtagtc agtgagtcta ggcaagatgt tggccctaaa aatccaaata ccagagaatt 1560  
catgagaaca tcacctggat gggacatgtg ccgagcaaca caattactat atgctaggca 1620  
ttgctatctt catattgaag atgaggaggt caagagatga aaaaagactt ggcaccttgt 1680  
tgttatatta aaatttattt ttagagttaga gctttgtaa gagtcttagga gtgtgggagc 1740  
taaatgatga tacacatgga cacaaagaat agatcaacag acacccaggc ctacttgagg 1800  
gttgggggtg ggaagagggaa gacgatgaaa aagaacctat tgggtattaa gttcatcact 1860  
gagtgatgaa ataatctgta catcaagacc cagtgatatg caatttacct atataacttg 1920  
tacatgtacc cccaaattta aaataaagtt aaaacaaagt ataggaatgg aattaattcc 1980

<210> 8  
<211> 6  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*

<400> 8  
tttaggg

6

<210> 9  
<211> 1884  
<212> DNA  
<213> *Homo sapiens*

<400> 9  
gtatatac atacccatgaa atggaaatcaa atatttttct aagatgaaac agtcatgatt 60

tatttcaaat aggtacggat aagtagatat tgaggtaagc attaggtctt atattatgta 120  
acactaatctt attactgcgc tgaaactgtg gtctttatga aaattgtttt cactacacta 180  
ttgagaaatt aagagataat ggcaaaaagtc acaaagagta tattcaaaaa gaagtatagc 240  
acttttcct tagaaaccac tgctaactga aagagactaa gatttgtccc gtcaaaaatc 300  
ctggacctat gcctaaaaca cattcacaa tccctgaact ttcaaaaaat tggtacatgc 360  
tttagctta aactacaggc ctcactggag ctacagacaa gaaggtaaaa aacggctgac 420  
aaaagaagtc ctggtatcct ctatgtggg agaaggaaac tagctaaagg gaagaataaa 480  
ttagagaaaa actggaatga ctgaatcgga acaaggcaaa ggctataaaa aaaattaagc 540  
agcagtatcc tcttggggc ccctccccca cactatctca atgcaaatat ctgtctgaaa 600  
cggtccctgg ctaaactcca cccatgggtt gccagcctt gccttgacca atagccttga 660  
caaggcaaac ttgaccaata gtcttagagt atccagttag gccaggggcc ggccgtggc 720  
tagggatgaa gaataaaaagg aagcacccctt cagcagttcc acacactcgc ttctggaacg 780  
tctgagatta tcaataagct cctagtcag acgccatggg tcatttcaca gaggaggaca 840  
aggctactat cacaagcctg tggggcaagg tgaatgtgga agatgctgga ggagaaaccc 900  
tgggaaggta ggctctggtg accaggacaa gggagggaag gaaggacctt gtgcctggca 960  
aaagtccagg tgccttcga ggatttggtt caccttcga ctgtcaaact gttcttgtca 1020  
atctcacagg ctctgggtt tctacccatg gacccagagg ttcttgacca gctttggca 1080  
cctgtcctct gcctctgcca tcatggcaaa ccccaaagtc aaggcacatg gcaagaaggt 1140  
gctgacttcc ttgggagatg ccataaagca cctggatgtat ctaaggggca ctttgccca 1200  
gctgagtgaa ctgcactgtg acaagctgca tgtggatcct gagaacttca aggtgagtcc 1260  
aggagatgtt tcagcactgt tgcccttagt ctgcaggcaaa cttagacaac tgagtattga 1320  
tctgagcaca gcagggtgtg agctgttga agatactggg gttgggagtg aagaaactgc 1380  
agaggactaa ctgggctgag acccagtggc aatgttttag ggcctaagga gtgcctctga 1440  
aaatcttagat ggacaactttt gactttgaga aaagagaggt ggaaatgagg aaaatgactt 1500

ttctttatta gatttcggta gaaagaacctt tcacccccc cctattttttgc ttattcgaaa 1560  
taaaaacatct atctggaggc aggacaagta tggcgtaaa aaagatgcag gcagaaggca 1620  
tatattggct cagtcaaagt ggggaacttt ggtggccaaa catacattgc taaggctatt 1680  
cctatatcag ctggcacatataaaatgct gctaattgtt cattacaaac ttatatcctt 1740  
taattccaga tgggggcaaa gtatgtccag gggtgaggaa caattgaaac atttgggctg 1800  
gagtagattt tgaaagtcag ctctgtgtgt gtgtgtgtgt cagcgtgtgt 1860  
ttcttttaac gtcttcagcc taca 1884

<210> 10  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 10  
aagaccagat agtacagggc ctggctac 28

<210> 11  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 11  
aagattttc aaggttacta tgaacacc 28

<210> 12  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 12  
tgctaatgt tcatctagaa acttataatcc tttaattc 38

<210> 13  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 13  
tttccactcg agccaaccag gaattcggca gttac 35

<210> 14  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 14  
gtgttaagaag gttctctaga ggctctacag ataggag 38

<210> 15  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 15  
aaggcagcact tgactcgagt atttttatac atgctctac 39

<210> 16  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 16

gtatacatac atacctgaat atg

23

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 17

tgtaggctga agacgttaaa agaaaacac

28

<210> 18

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer for RT-PCR

<400> 18

gatgccataa agcacctgga tg

22

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer for RT-PCR

<400> 19

ttgcagaata aagcctatcc ttga

24

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Primer for RT-PCR

<400> 20  
tcacccacac tgtgcccatc tacga

25

<210> 21  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Primer for RT-PCR

<400> 21  
cagcggaacc gctcattgcc aatgg

25

<210> 22  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 22  
catcgctct ctgaaaaatc g

21

<210> 23  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:PCR primer

<400> 23  
aggaaaacagc aaaactgtga c

21

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/JP03/11134

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (STN), JSTPlus/JST7580 (JOIS)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	GRIMES, B.R. et al., Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome, EMBO Rep., 2001, Vol.2, No.10, pages 910 to 914	1, 3-6, 8-11, 14-15, 17, 19-20, 26-29, 31-35, 40, 43-45, 51-56 /2, 7, 12-13, 16, 18, 21-25, 30, 36-39, 41-42, 46-50
X/Y	Tsuneko OKAZAKI, "Honyurui Jinko Senshokutai no Kaihatsu to Kotai no Keishitsu Tenkan eno Riyo", Senryakuteki Kiso Kenkyu Suishin Jigyo Kenkyu Nenpo, 2002 March, Vol.2000, pages 61 to 64	46-49/2, 7, 12-13, 18, 21-25, 36, 46-50

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
08 October, 2003 (08.10.03)

Date of mailing of the international search report  
28 October, 2003 (28.10.03)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11134

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yoshimi KUROIWA et al., "Hito Mini Senshokutai Vector o Mochiita Mega Base (Mb) Size no Tokutei Hito Senshokutai Ryoiki no Cloning System no Kaihatsu, Experimental Medicine, 2001, Vol.19, No.1, pages 50 to 52	18,21-22, 24-29,31-34, 40-45,51-56
Y	HASEGAWA, K. et al., Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis, FEBS Lett., 2002 June, Vol.520, No.1-3, pages 47 to 52	16,30,50
Y	RIVELLA, S. et al., The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites, J.Virol., 2000, Vol.74, No.10, pages 4679 to 4687	16,30,50
Y	Shin'ichi HORIIE et al., "Bisho Kakusaibo Yugoho o Riyo Shita Senshokutai Kogaku", Saibo, 2001, Vol.33, No.3, pages 114 to 117	37-39,41-42
P,X	Tsuneko OKAZAKI, "Honyurui Jinko Senshokutai no Kochiku to Sono Riyō", 'Seimeい Katsudo no Program', Heisei 9 Nendo Saitaku Kenkyu Kadai Shuryo Symposium Koen Yokoshu, 2002 November, pages 14 to 18	1-56

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/11134

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2.  Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet.)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/11134

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

(1) The inventions as claimed in claims 1, 35 and 37, the parts of claims 3 to 16 concerning claim 1 and the part of claim 39 concerning claim 37 relate to a process for constructing an artificial mammalian chromosome which involves the step of transferring a first cyclic vector containing a mammalian centromere sequence and a second cyclic vector containing a functional sequence into mammalian host cells.

(2) The inventions as claimed in claims 2, 36 and 38, the parts of claims 3 to 16 concerning claim 2 and the part of claim 39 concerning claim 38 relate to a process for constructing an artificial mammalian chromosome which involves the step of transferring a first vector comprising an artificial yeast chromosome containing a mammalian centromere sequence and a second vector comprising an artificial yeast chromosome containing a functional sequence into mammalian host cells.

The technical feature common to the invention groups (1) and (2) resides in a process for constructing an artificial mammalian chromosome which involves the step of transferring a first vector containing a mammalian centromere sequence and a second vector containing a functional sequence into mammalian host cells. However, this point had been already publicly known as reported in, for example, "EMBO Rep, 2001, Vol.2, No.10, pp.910-914" and, therefore, cannot be regarded as a special technical feature.

(3) The inventions as claimed in claims 17 and 19 to 20 and the parts of claims 27 to 34, 40 to 45, 52, 54 and 56 concerning claims 17 and 19 to 20 relate to an artificial mammalian chromosome which has a mammalian replication origin, a mammalian centromere sequence and a functional sequence, is in a cyclic form, can be replicated in mammalian cells, extrachromosomally held in the host cells and transferred to daughter cells in cell division.

(4) The inventions as claimed in claims 18 and 21 to 22 and the parts of claims 27 to 34, 40 to 45, 52, 54 and 56 concerning claims 18 and 21 to 22 relate to an artificial mammalian chromosome which has a mammalian replication origin, a mammalian centromere sequence, a mammalian telomere sequence and a functional sequence, is in a linear form, can be replicated in mammalian cells, extrachromosomally held in the host cells and transferred to daughter cells in cell division.

(5) The inventions as claimed in claims 23 to 26 and the parts of claims 27 to 34, 40 to 45, 52, 54 and 56 concerning claims 23 to 26 relate to an artificial mammalian chromosome which has a mammalian replication origin, a mammalian centromere sequence and a sequence for insertion, is in a cyclic form, can be replicated in mammalian cells, extrachromosomally held in the host cells and transferred to daughter cells in cell division.

As reported in, for example, 'EMBO Rep, Vol.2, NO.10, pp.910-914' and 'Experimental medicine, 2001, vol.19, No.1, pages 50 to 52', an artificial mammalian chromosome having a mammalian replication origin, a mammalian centromere sequence and a functional sequence and an artificial mammalian chromosome having a mammalian replication origin and a mammalian centromere sequence being in a cyclic form had been already publicly known. Thus, there is no technical relationship involving any special technical feature among the invention groups (3), (4) and (5).

(continued to extra sheet)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP03/11134

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

(6) The inventions as claimed in claims 46 to 49 relate to a vector to be used in constructing an artificial mammalian chromosome containing a mammalian centromere sequence of about 50 kb or less in size and a selection marker gene.

(7) The invention as claimed in claim 50 relates to a vector to be used in constructing an artificial mammalian chromosome containing a sequence having a function of inserting a desired sequence which is loxP or FRT and an insulator sequence.

There is no technical relationship among the invention groups (6) and (7) and the above invention groups (1) to (5) involving any special technical feature. The technical feature common to the invention groups (6) and (7), i.e., a vector to be used in constructing an artificial mammalian chromosome, had been publicly known as reported by the above documents, etc. Thus, there is no technical relationship involving any special technical feature.

(8) The invention as claimed in claim 51 relates to a nonhuman transformant animal having an artificial mammalian chromosome transferred thereinto.

(9) The invention as claimed in claim 53 relates to XO type mouse embryonic liver cells having an artificial mammalian chromosome transferred thereinto.

(10) The invention as claimed in claim 54 relates to a female chimeric mouse having an artificial mammalian chromosome transferred thereinto.

'As reported in 'Experimental medicine, 2001, Vol.19, No.1, pages 50 to 52', etc., there had been already publicly known transformed cells and a transformant animal having an artificial mammalian chromosome transferred thereinto. Accordingly, there is no relationship among the inventions (8) to (10) involving any special technical feature.

Such being the case, it is recognized that the claims of the present case have 10 groups of inventions.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
Int. C1.7 C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））  
Int. C1.7 C12N15/09, C12N5/10, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）  
BIOSIS/WPI(DIALOG), MEDLINE(STN), JSTPlus/JST7580(JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y	GRIMES, B. R. et al., Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome, EMBO Rep, 2001, Vol. 2, No. 10, pp. 910-914	1, 3-6, 8-11, 1 4-15, 17, 19-2 0, 26-29, 31-3 5, 40, 43-45, 5 1-56 /2, 7, 12-13, 1 6, 18, 21-25, 3 0, 36-39, 41-4 2, 46-50

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
08.10.03

国際調査報告の発送日  
28.10.03

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）  
七條 里美

4B 2936



電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) .	関連すると認められる文献	関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X/Y	岡崎恒子, ほ乳類人工染色体の開発と個体の形質転換への利用, 戦略的基礎研究推進事業研究年報, 2002年3月, Vol. 2000, pp. 61-64	46-49/2, 7, 12-13, 18, 21-25, 36, 46-50
X	黒岩義巳他, ヒトミニ染色体ベクターを用いたメガベース (M b) サイズの特定ヒト染色体領域のクローニングシステムの開発, 実験医学, 2001, Vol. 19, No. 1, pp. 50-52	18, 21-22, 24-29, 31-34, 40-45, 51-56
Y	HASEGAWA, K. et al., Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis, FEBS Lett. 2002 Jun, Vol. 520, No. 1-3, pp. 47-52	16, 30, 50
Y	RIVELLA, S. et al., The chS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites, J Virol, 2000, Vol. 74, No. 10, pp. 4679-4687	16, 30, 50
Y	堀家慎一他, 微小核細胞融合法を利用した染色体工学, 細胞, 2001, Vol. 33, No. 3, pp. 114-117	37-39, 41-42
PX	岡崎恒子, 哺乳類人工染色体の構築とその利用, 「生命活動のプログラム」平成9年度採択研究課題終了シンポジウム講演予稿集, 2002年11月, pp. 14-18	1-56

**第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)**

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であって PCT 規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

**第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)**

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(特別ページ) 参照

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

**追加調査手数料の異議の申立てに関する注意**

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

(1) 請求の範囲 1, 35, 37 及び請求の範囲 3-16 のうち請求の範囲 1 に関する部分、請求の範囲 39 のうち請求の範囲 37 に関する部分は、哺乳類セントロメア配列を含む環状の第 1 ベクターと、機能配列を含む環状の第 2 ベクターとを哺乳類宿主細胞に導入する工程を含む哺乳類人工染色体の作製方法に係る発明である。

(2) 請求の範囲 2, 36, 38 及び請求の範囲 3-16 のうち請求の範囲 2 に関する部分、請求の範囲 39 のうち請求の範囲 38 に関する部分は、哺乳類セントロメア配列を含む酵母人工染色体からなる第 1 ベクターと、機能配列を含む酵母人工染色体からなる第 2 ベクターとを哺乳類宿主細胞に導入する工程を含む哺乳類人工染色体の作製方法に係る発明である。

発明 (1) と (2) に共通する技術的特徴は、哺乳類セントロメア配列を含む第 1 ベクターと、機能配列を含む第 2 ベクターとを哺乳類宿主細胞に導入する工程を含む哺乳類人工染色体の作製方法という点であるが、この点は、例えば、「EMBO Rep, 2001, Vol. 2, No. 10, pp. 910-914」に記載されるように、既に公知であるから、特別な技術的特徴であるとは言えない。

(3) 請求の範囲 17, 19-20 及び請求の範囲 27-34, 40-45, 52, 54, 56 のうち請求の範囲 17, 19-20 に関する部分は、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列を有し、環状であって、哺乳類細胞内で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体に係る発明である。

(4) 請求の範囲 18, 21-22 及び請求の範囲 27-34, 40-45, 52, 54, 56 のうち請求の範囲 18, 21-22 に関する部分は、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、哺乳類テロメア配列、及び、機能配列を有し、線状であって哺乳類細胞内で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体に係る発明である。

(5) 請求の範囲 23-26 及び請求の範囲 27-34, 40-45, 52, 54, 56 のうち請求の範囲 23-26 に関する部分は、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び挿入用配列を有し、環状であって、哺乳類細胞内で複製され、宿主細胞の染色体外に維持され、細胞分裂の際に娘細胞に伝達される哺乳類人工染色体に係る発明である。

ここで、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列、及び機能配列を有する哺乳類人工染色体や、哺乳類複製起点、哺乳類セントロメア配列を有し、環状である哺乳類人工染色体は、「EMBO Rep, 2001, Vol. 2, No. 10, pp. 910-914」、「実験医学, 2001, Vol. 19, No. 1, pp. 50-52」に記載されるように、既に公知であるから、発明 (3)、(4)、(5) は、何ら特別な技術的特徴を含む技術的な関係にはない。

(6) 請求の範囲 46-49 は、サイズが約 50 kb 以下の哺乳類セントロメア配列、及び選択マーカー遺伝子を含む哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターに係る発明である。

(7) 請求の範囲 50 は、 $1\circ \times P$  若しくは F R P である所望の配列を挿入する機能を有する配列とインスレーター配列とを含む哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターに係る発明である。

ここで、発明 (6)、(7) は、上記発明 (1) ~ (5) と特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないし、発明 (6) と (7) における共通する技術的特徴である、哺乳類人工染色体の作製に使用されるベクターという点は、上述の文献等に記載されるように既に公知であるから、何ら特別な技術的特徴を含む技術的な関係にはない。

(8) 請求の範囲 51 は、哺乳類人工染色体が導入されてなる非ヒト形質転換動物に係る発明である。

(9) 請求の範囲 53 は、哺乳類人工染色体が導入されてなる X O 型マウス胚性肝細胞に係る発明である。

(10) 請求の範囲 54 は、哺乳類人工染色体が導入されてなるメスキメラマウスに係る発明である。

「実験医学, 2001, Vol. 19, No. 1, pp. 50-52」等に記載されるように哺乳類人工染色体が導入された形質転換細胞及び形質転換動物は、既に公知であるから、発明 (8) ~ (10) は、特別な技術的特徴を含む関係にはない。

よって、本出願の請求の範囲に記載された発明の数は 10 と認める。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.